

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Effet de l'hypertrophie cardiaque physiologique et  
pathologique sur la régulation du pore de  
perméabilité transitionnelle**

par

Mariannick Marcil

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Sciences de l'activité physique

avril, 2008

© Mariannick Marcil, 2008



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Effet de l'hypertrophie cardiaque physiologique et pathologique sur la régulation du  
pore de perméabilité transitionnelle

présentée par :  
Mariannick Marcil

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Marc Lavoie  
président-rapporteur

Yan Burelle  
directeur de recherche

François Péronnet  
co-directeur

Raynald Bergeron  
membre du jury

Renée Ventura-Clapier  
examinatrice externe

Marielle Ledoux  
représentante de la doyenne de la FESP

## RESUME

Il a été proposé que la mitochondrie puisse jouer un rôle important dans la pathogénèse du dommage ischémique et de la défaillance cardiaque via l'activation de la voie apoptotique intrinsèque ou de l'ouverture d'un pore non-spécifique de la membrane interne mitochondriale, le pore de perméabilité transitionnelle (PTP) dont l'implication dans la mort cellulaire tant nécrotique qu'apoptotique est maintenant bien documentée. Par ailleurs, des études épidémiologiques montrent que l'exercice régulier diminue non seulement la mortalité et la morbidité associées à la cardiopathie ischémique, mais qu'il diminue l'incidence d'un infarctus du myocarde chez une population physiquement active comparativement à une population sédentaire. Des études chez l'animal ont permis d'associer plus précisément l'effet cardioprotecteur de l'exercice à une meilleure résistance aux dommages induits par l'ischémie-reperfusion (IR) et une modulation de l'ouverture du PTP pourrait contribuer à cet effet cardioprotecteur.

La présente thèse comporte trois projets étudiant le rôle du PTP dans l'hypertrophie cardiaque. La première étude se penche sur la régulation du PTP dans l'effet cardioprotecteur de l'entraînement en endurance chez le Rat. Les résultats obtenus montrent que le contrôle de l'ouverture du PTP est influencé par le type de substrat énergétique oxydé, les substrats du complexe I étant des agents facilitateurs de l'ouverture par rapport aux substrats spécifiques au complexe II. De plus, l'entraînement est associé à une diminution de la susceptibilité à l'ouverture du PTP, mais uniquement en présence de substrats du complexe II, sans qu'il y ait de modification de la fonction respiratoire, du potentiel de membrane, des niveaux endogènes de nucléotides adényliques ou du potentiel redox. Globalement, ces résultats constituent les premières évidences supportant l'idée que l'entraînement puisse entraîner une diminution de la susceptibilité du PTP à l'ouverture, une adaptation qui pourrait être bénéfique et contribuer à la protection du cœur post-ischémie.

La deuxième étude se penche sur la régulation du PTP dans un cœur hypertrophié suite à une surcharge volémique chronique (ACF). Nos résultats montrent que les mitochondries isolées à partir de cœurs ACF sont plus vulnérables à un stress oxydant ou calcique aigu que les mitochondries des cœurs normaux. Cet effet est observable au cours de la phase d'hypertrophie compensée, en absence de dysfonction systolique évidente et de perturbations de la fonction mitochondriale basale mesurée en absence de stress. De plus, cette vulnérabilité est observable *in situ* dans le cœur isolé soumis à une IR et ce phénomène est associé à une moins bonne récupération fonctionnelle ainsi qu'à un niveau de dommage tissulaire accru. Cette étude constitue à notre connaissance une des premières évidences suggérant que la vulnérabilité mitochondriale au stress puisse se développer de manière précoce au cours de l'hypertrophie compensée et pourrait ainsi contribuer au déclenchement de la mort cellulaire apoptotique et à l'apparition des dysfonctions mitochondriales sévères qui sont typiquement observées lorsque le cœur atteint le stade d'insuffisance.

Notre troisième étude porte sur le lien entre la vulnérabilité mitochondriale au stress et la susceptibilité à la décompensation cardiaque. Les résultats ont montré qu'une fistule aorto-cavale affecte de façon différente le Rat SD et le Rat WKHA, induisant un remodelage plus rapide chez le rat SD. De plus, les taux de morbidité et de mortalité en réponse à la fistule sont significativement plus élevés chez le Rat SD, suggérant une susceptibilité accrue à la décompensation cardiaque dans cette souche. En réponse à la surcharge volémique, la fonction contractile lors de l'IR est altérée dans les deux souches de rats, mais l'altération apparaît plus rapidement chez le Rat SD. Toutefois, aucune différence significative n'est observable quant au niveau d'ouverture du PTP *in vivo* ou *in vitro* entre les deux souches suggérant que la susceptibilité mitochondriale au stress n'explique pas les différentes susceptibilités à la décompensation.

**MOTS-CLES**

Mitochondrie

Pore de perméabilité transitionnel

Hypertrophie cardiaque

Exercice

Surcharge volumique chronique

## ABSTRACT

It has been suggested that mitochondria could play an important role in the pathogenesis of ischemic heart disease and heart failure either by the activation of the intrinsic apoptotic pathway or by the opening the permeability transition pore (PTP), which role in necrotic and apoptotic cell death as been largely documented. On the other hand, epidemiological studies show that regular physical activity is not only effective in reducing cardiovascular mortality and morbidity but also decreases the incidence of myocardial infarction. Furthermore, studies on rodents have shown that this cardioprotection is due in part to a decreased susceptibility of the trained heart to ischemia-reperfusion (IR) injury and dysfunction and that a modulation of PTP opening could contribute to this phenomenon.

This thesis is composed of three research studies designed to evaluate the regulation of PTP opening in the hypertrophied heart. The aim of the first study was to evaluate the role of PTP opening in the cardioprotection induced by regular exercise. Our results show that PTP opening is modulated by the type of respiratory substrate oxidized, with complex I substrates acting as sensitizers to PTP opening compared with complex II substrates. Furthermore, regular exercise was associated with a decreased susceptibility to PTP opening when mitochondria were energized with complex II substrates. This was not associated with changes in respiratory function, membrane potential, adenylate content or NAD(P)H ratio. Together, these results are the first to show that regular exercise could decrease the susceptibility to PTP opening and could thus contribute to protect the post-ischemic heart.

The aim of the second study was to evaluate PTP regulation after 12 weeks of chronic volume overload induced by means of an aorto-caval fistula (ACF). Our results show that ACF mitochondria displayed a greater sensitivity to PTP opening in response to oxidative and calcium stresses compared to sham mitochondria. This phenomenon was observed at a time when adverse ventricular remodelling was present but systolic and overt mitochondrial dysfunctions in the absence of stress had not occurred yet. Furthermore, an increased vulnerability to PTP opening *in situ* as

well as a more impaired functional recovery and greater tissue damage following IR were observed in ACF compared to sham isolated hearts. To our knowledge, this constitutes the first results suggesting that mitochondrial vulnerability to stress could occur during the compensated stage of hypertrophy and could thus contribute to the activation of apoptosis and the development of overt mitochondrial dysfunctions typically observed in the failing stage.

The aim of the third study was to evaluate the role of mitochondrial vulnerability to stress in the transition toward decompensation in two genetically different strains of rats. Our results show that an ACF has different effect on SD and WKHA rats, inducing a more rapid cardiac remodeling in SD rats. Furthermore, mortality and morbidity rates were increased in SD rats compared to WKHA, suggesting an increased susceptibility to decompensation in that strain. When SD and WKHA hearts were submitted to IR, contractile function was altered in both strains but a dysfunction was observed sooner in SD rats. However, no significant difference in the *in vivo* or *in vitro* susceptibilities to PTP opening was observed between SD and WKHA rats suggesting that mitochondrial vulnerability to stress could not explain the different susceptibilities to decompensation.



**KEYWORDS**

Mitochondria

Permeability transition pore

Cardiac hypertrophy

Exercise

Chronic volume overload

## TABLE DES MATIERES

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RÉSUMÉ</b> .....  | <b>III</b>  |
| <b>MOTS-CLÉS</b> .....   | <b>V</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>VI</b>   |
| <b>KEYWORDS</b> .....  | <b>VIII</b> |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....  | <b>IX</b>   |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....  | <b>XI</b>   |
| <b>LISTE DES FIGURES</b> .....   | <b>XII</b>  |
| <b>ABRÉVIATIONS</b> .....  | <b>XIII</b> |
| <b>REMERCIEMENTS</b> .....   | <b>XVII</b> |
| <b>AVANT-PROPOS</b> .....  | <b>1</b>    |
| <i>1. Revue de littérature</i> .....   | <i>5</i>    |
| <i>1.1. Introduction</i> .....   | <i>5</i>    |
| <i>1.2. Mort cellulaire et mitochondrie</i> .....  | <i>8</i>    |
| 1.2.2. Nécrose .....   | 10          |
| 1.2.3. Apoptose.....   | 12          |
| 1.2.3.1. Famille des caspases .....  | 13          |
| 1.2.3.2. Voie extrinsèque .....  | 14          |
| 1.2.3.3. Voie intrinsèque.....   | 15          |
| 1.2.3.3.1. Perméabilisation de l'OM et famille de Bcl-2 .....  | 16          |
| 1.2.3.3.2. Perméabilisation de l'IM et pore de perméabilité transitionnelle.....                     | 17          |
| 1.2.3.3.3. Relâche mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques.....                                  | 18          |
| 1.2.3.3.4. Interaction entre les voies extrinsèque et intrinsèque.....                               | 19          |
| 1.2.4. Pore de perméabilité transitionnelle (PTP).....   | 19          |
| 1.2.4.1. Identité moléculaire .....  | 19          |
| 1.2.4.2. Régulation de l'ouverture du PTP.....   | 22          |
| 1.2.4.2.1. Ouverture régulée du PTP .....  | 23          |
| 1.2.4.2.2. Ouverture non-régulée du PTP .....  | 27          |
| <i>1.3. Dommage ischémique : rôle des mitochondries et du PTP</i> .....                              | <i>29</i>   |
| <i>1.4. Exercice et cardioprotection</i> .....   | <i>35</i>   |
| 1.4.2. Introduction .....  | 35          |
| 1.4.3. Effets de l'entraînement sur les propriétés fonctionnelles et le dommage post-ischémique..... | 36          |
| 1.4.4. Mécanismes proposés .....   | 41          |

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| 1.4.4.1. | Stress oxydant .....   | 42  |
| 1.4.4.2. | Protéines chaperonnes (HSP).....   | 44  |
| 1.4.4.3. | Canaux K-ATP.....  | 45  |
| 1.4.4.4. | Dynamique calcique .....   | 47  |
| 1.4.4.5. | Fonction mitochondriale.....   | 48  |
| 1.4.4.6. | Effecteurs de mort cellulaire .....  | 51  |
| 1.4.5.   | Résumé.....  | 53  |
| 1.5.     | <i>Hypertrophie pathologique</i> .....   | 54  |
| 1.5.2.   | Introduction .....   | 54  |
| 1.5.3.   | Dysfonctions mitochondriales dans le cœur insuffisant .....                                      | 55  |
| 1.5.4.   | Dysfonctions mitochondriales dans le cœur compensé .....   | 61  |
| 1.5.5.   | Rôle des mitochondries dans la signalisation de la mort cellulaire dans le cœur insuffisant..... | 64  |
| 1.5.6.   | Rôle des mitochondries dans la signalisation de la mort cellulaire dans le cœur compensé.....    | 71  |
| 2.       | <i>Résultats</i> .....   | 76  |
| 2.1.     | <i>Article 1</i> .....   | 76  |
| 2.2.     | <i>Article 2</i> .....   | 114 |
| 2.3.     | <i>Article 3</i> .....   | 154 |
| 3.       | <i>Discussion</i> .....  | 191 |
| 3.1.     | <i>Discussion générale</i> .....   | 191 |
| 3.1.2.   | Considérations expérimentales.....   | 191 |
| 3.1.2.   | Pistes de réflexion sur les 3 études présentées dans cette thèse.....                            | 194 |
| 3.1.2.1. | Vulnérabilité mitochondriale et expression de CypD.....  | 196 |
| 3.1.2.2. | Vulnérabilité mitochondriale et production de ROS .....  | 199 |
| 3.1.2.3. | Vulnérabilité mitochondriale et susceptibilité à la décompensation cardiaque .....               | 200 |
| 4.       | <i>Conclusion</i> .....  | 203 |
| 5.       | <i>Bibliographie</i> .....   | 205 |

**LISTE DES TABLEAUX**

|  |    |
|--|----|
| Tableau I. Études rapportant un effet cardioprotecteur d'un exercice avec hypertrophie cardiaque.....  | 39 |
| Tableau II. Études rapportant un effet cardioprotecteur d'un exercice sans hypertrophie cardiaque..... | 40 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Schématisation des voies métaboliques au niveau du cœur.....   | 9  |
| Figure 2. Caractéristiques ultrastructurales de l'apoptose et de la nécrose d'un cardiomyocyte. ....                             | 11 |
| Figure 3. Représentation schématique des voies extrinsèque et intrinsèque pro-apoptotiques.....                                  | 15 |
| Figure 4. Pore de perméabilité transitionnelle.....  | 21 |
| Figure 5. Résumé des principaux facteurs qui régulent l'état d'ouverture du PTP.....   | 26 |
| Figure 6. Schéma illustrant l'hypothèse de l'ouverture non-régulée du pore de perméabilité transitionnelle. ....                 | 28 |
| Figure 7. La CsA et la SfA protègent le cœur ischemique du dommage induit lors de la reperfusion.....                            | 31 |
| Figure 8. Séquestration mitochondriale de déoxyglucose lors de la reperfusion suite à une période d'ischémie de 30 minutes. .... | 32 |
| Figure 9. Ischémie-reperfusion et ouverture du PTP. ....   | 34 |
| Figure 10. Meilleur maintien de la fonction contractile lors de l'IR avec l'exercice.  | 37 |
| Figure 11. L'entraînement diminue la taille de l'infarctus suite à une IR.....   | 38 |
| Figure 12. L'entraînement prévient la diminution de la respiration mitochondriale après l'IR.....                                | 50 |
| Figure 13. Ultrastructure cellulaire et mitochondriale dans un coeur défaillant. ....  | 56 |
| Figure 14. Consommation d'oxygène de mitochondries isolées de cœurs défaillants.   | 58 |
| Figure 15. Fonction respiratoire de base de mitochondries de cœurs hypertrophiés. .  | 62 |
| Figure 16. La vulnérabilité mitochondriale aux stress oxydants et calciques est augmentée dans le cœur défaillant. ....          | 67 |
| Figure 17. L'ouverture du PTP est augmentée suite à une ligature de l'artère coronaire chez le rat.....                          | 68 |
| Figure 18. Effet de CsA sur le potentiel de membrane de cardiomyocytes normaux (NL) et défaillants (HF).....                     | 70 |
| Figure 19. Augmentation de la susceptibilité aux stimuli apoptotique avec l'hypertrophie pathologique.....                       | 73 |

## ABRÉVIATIONS

|            |   |
|------------|---|
| [3H]-DOG:  | 2-déoxy[3H]glucose  |
| $\Psi_m$ : | potentiel de membrane mitochondrial   |
| ACF :      | <i>aorto-caval fistula</i>  |
| ADN :      | acide désoxyribonucléique   |
| ADNmt :    | acide désoxyribonucléique mitochondrial   |
| ADP :      | adénosine diphosphate   |
| AIF :      | <i>apoptosis-inducing factor</i>  |
| ANT :      | <i>adenine nucleotide translocase</i>   |
| Apaf-1 :   | <i>apoptosis protease activating factor-1</i>   |
| AR:        | anoxie-réoxygénation  |
| ARNm:      | acide ribonucléique messenger   |
| ATP :      | adénosine triphosphate  |
| BA :       | <i>bongkrelic acid</i>  |
| C:         | <i>control</i>  |
| CAT :      | catalase  |
| CCCP :     | carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone  |
| CS :       | citrate synthase  |
| COX :      | <i>cytochrome c oxidase</i>   |
| CRC:       | capacité de retention calcique  |
| CsA :      | cyclosporine A  |
| CypD :     | cyclophiline D  |
| Cyt c :    | cytochrome c  |
| Da :       | Dalton  |
| DNP :      | 2,4-dinitrophénol   |
| EGTA:      | <i>1 Ethyleneglycol-bis(<math>\beta</math>-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> |
| EndoG :    | endonucléase G  |
| GPx:       | glutathion peroxydase   |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| GSH:                            | glutathion réduit  |
| GSSG:                           | glutathion oxydé   |
| HK:                             | hexokinase   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : | peroxide d'hydrogène   |
| HSP:                            | <i>heat shock protein</i>  |
| IM:                             | <i>inner (mitochondrial) membrane</i>  |
| IMS:                            | <i>(mitochondrial) intermembrane space</i>   |
| iNOS:                           | <i>inducible nitric oxide synthase</i>   |
| IR:                             | ischémie-reperfusion   |
| JO <sub>2</sub> :               | consommation d'oxygène   |
| LDH:                            | lactate déshydrogénase   |
| LVDP:                           | <i>left ventricular developed pressure</i>   |
| LV :                            | <i>left ventricle</i>  |
| LVH :                           | <i>left ventricular hypertrophy</i>  |
| MDA:                            | malondialdéhyde  |
| NO :                            | oxyde nitrique   |
| OM:                             | <i>outer (mitochondrial) membrane</i>  |
| Omi/HtrA2:                      | <i>Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2</i>                     |
| ONOO- :                         | peroxynitrite  |
| Pi:                             | phosphate inorganique  |
| PBR:                            | <i>peripheral benzodiazepine receptor</i>  |
| PCD:                            | <i>programmed cell death</i>   |
| PN:                             | <i>pyridine nucleotides</i>  |
| RCR:                            | <i>respiratory control ratio</i>   |
| ROS:                            | <i>reactive oxygen species</i>   |
| RV:                             | <i>right ventricle</i>   |
| SD :                            | Sprague-Dawley   |
| SfA :                           | sanglifehrine A  |
| Smac/DIABLO:                    | second mitochondrial activator of caspase /direct inhibitor of apoptosis bonding protein with low PI |
| SOD:                            | superoxyde dismutase   |

|                      |  |
|----------------------|--|
| PTP :                | <i>permeability transition pore</i>                        |
| T:                   | <i>trained</i>   |
| TNF $\alpha$ :       | <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>           |
| TUNEL:               | <i>terminal dUTP nick end labelling of DNA</i>             |
| UCP:                 | <i>uncoupling protein</i>                                  |
| V <sub>ADP</sub> :   | vitesse de la phosphorylation oxydative stimulée par l'ADP |
| V <sub>oligo</sub> : | vitesse de la respiration restreinte par l'oligomycine     |
| VDAC :               | <i>voltage-dependent anion channel</i>                     |
| WKHA :               | <i>wistar-kyoto hyperactive</i>                            |
| WT:                  | <i>wild type</i>   |



*À ma famille*

## REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier mon directeur de thèse, Yan Burelle, de m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi passionnant, mais surtout de m'avoir soutenue et encouragée, particulièrement dans les deux dernières années. J'ai beaucoup appris sur la mitochondrie, sur la vie universitaire et sur moi-même grâce à lui et je lui en suis très reconnaissante. Je remercie également François Péronnet de m'avoir encadrée durant ma maîtrise, de m'avoir dirigée vers Yan Burelle et d'avoir su m'écouter dans les moments plus difficiles de mes études doctorales.

Je voudrais également remercier plusieurs personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler ou qui m'ont aidée durant mes études supérieures : Pierre Corriveau, Christian F. Deschepper, Karine Bourduas, Sonia Bélanger, Antony Karelis, Kristina Csukly, Éric Beaumont, Christopher Nolan, Marcel Beaulieu, Jacques Nuckle, Yves Poussart. Un merci très spécial à Phillip F. Gardiner et à Martin Brochu.

De plus, je remercie du fond du cœur mes amis: Alexandre Charbonneau, Hugo Centomo, Marie-Eve Mathieu, Florence Conus, Alexis Ascah, Natalie Chapados, Jonathan Tremblay, Bruno Cormery, Jimmy Matas, Julie Nantel, Chantale Racette et Philippe Lebrun, Darren Mackinnon et la gang de Québécois de Moncton : Gaétan Moreau et Nathalie Mailhot, Nellie Gagné et Gilles Miron, Martin Filion et Julie Carpentier.

Un merci immense à ma mère, mon père, mon frère et Serge qui m'ont répété plusieurs fois : « chiâle, mais ne lâche pas » et qui ont été là pour moi dans les beaux et les moins beaux moments. Merci à Oli le chat pour la zoothérapie ! Et finalement, merci à ma fille, Émilie, qui m'a poussé à terminer non pas à l'aide de coups de pieds dans le derrière, mais bien à l'aide de coups de pieds dans le bedon !

## AVANT-PROPOS

Les travaux faisant l'objet de cette thèse ont été élaborés dans le laboratoire du Dr Yan Burelle. Les problématiques de recherche privilégiées dans ce laboratoire touchent principalement la plasticité mitochondriale dans le muscle strié en réponse à divers stimuli tant physiologiques (entraînement, exercice aigu) que pathologiques (remodelage et insuffisance cardiaque, inactivité musculaire et atrophie). Plus précisément, les travaux réalisés sous la supervision du Dr Burelle s'intéressent à la fonction mitochondriale et à la régulation du pore de perméabilité transitionnelle (PTP), un pore de la membrane interne mitochondriale, dont l'ouverture est impliquée dans le déclenchement de la mort cellulaire.

S'inscrivant dans cette ligne de pensée, mes travaux de doctorat ont porté sur l'étude de la fonction mitochondriale au niveau du muscle cardiaque. La première problématique abordée dans cette thèse concerne l'effet d'une hypertrophie physiologique induite par un entraînement régulier sur la fonction mitochondriale et sur la régulation du PTP. L'intérêt principal de cette étude était d'aborder le rôle de la mitochondrie dans le phénomène de la cardioprotection induite par l'entraînement et d'investiguer l'implication potentielle du PTP dans ce phénomène. Il est maintenant bien documenté qu'un exercice régulier contribue à diminuer l'incidence d'infarctus du myocarde ainsi que la mortalité et la morbidité associées aux maladies cardiovasculaires (200, 216, 260). Par ailleurs, on associe de plus en plus ce phénomène à une meilleure résistance du cœur entraîné aux dommages causés par la mort des cardiomyocytes lors de l'ischémie-reperfusion (13, 228, 229). De plus, il est maintenant bien accepté que la mitochondrie puisse jouer un rôle primordial dans le déclenchement de la mort cellulaire tant nécrotique qu'apoptotique et qu'un élément clé de ce phénomène pourrait être l'ouverture du PTP (107, 139). Compte-tenu de ces informations, il nous apparaissait intéressant d'évaluer la fonction mitochondriale d'un cœur de Rat entraîné, d'étudier la susceptibilité des

mitochondries isolées à partir de ce tissu à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique, et d'investiguer les mécanismes potentiellement impliqués dans cet effet.

Les résultats de cette étude, publiée dans *The American Journal of Physiology* ont montré que, comme dans d'autres tissus, le contrôle de l'ouverture du PTP est influencé par le type de substrat énergétique oxydé, les substrats du complexe I étant des agents facilitateurs de l'ouverture par rapport aux substrats spécifiques au complexe II. Nous avons également montré que l'entraînement est associé à une diminution de la susceptibilité à l'ouverture du PTP, mais que cet effet n'est observable qu'en présence de substrats du complexe II. Les expériences effectuées dans le but d'identifier les mécanismes en cause ont révélé que cet effet de l'entraînement ne pouvait pas être expliqué par une modification de la fonction respiratoire, du potentiel de membrane, des niveaux endogènes de nucléotides adényliques ou du potentiel redox. Globalement, ces résultats constituent les premières évidences supportant l'idée que l'entraînement entraîne une diminution de la susceptibilité du PTP à l'ouverture, une adaptation qui pourrait être bénéfique et contribuer à la protection du cœur post-ischémie.

Les résultats de cette première étude nous ont ensuite incité à formuler l'hypothèse selon laquelle l'hypertrophie pathologique, qui est généralement associée à une plus grande vulnérabilité cardiaque au stress (7, 148), pourrait induire l'effet inverse. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué la vulnérabilité mitochondriale au stress chez des rats WKHA soumis à une surcharge volumique induite par la création d'une fistule aorto-cavale (ACF). Ce modèle expérimental de remodelage ventriculaire place les cardiomyocytes en état de stress chronique sans toutefois induire de dysfonction systolique précoce, cette dernière ne se développant que lorsque le cœur a épuisé sa réserve contractile. Cette approche a donc permis d'étudier la fonction mitochondriale à une étape bien définie de la pathologie. Les résultats de cette étude, qui a été publiée dans *The Journal of Molecular and Cellular*

*Cardiology*, ont montré que les mitochondries isolées à partir de cœurs ACF sont plus vulnérables à l'anoxie-reoxygénation et à l'ouverture du PTP induite par un stress calcique que les mitochondries des cœurs normaux. Cet effet est observable au cours de la phase d'hypertrophie compensée, en absence de dysfonction systolique évidente et de perturbations de la fonction mitochondriale basale mesurée en absence de stress. Nous avons également montré, en mesurant directement l'ouverture du PTP *in situ*, que cette vulnérabilité est observable *in vivo* dans le cœur isolé soumis à une ischémie-reperfusion et que ce phénomène est associé à une moins bonne récupération fonctionnelle ainsi qu'à un niveau de dommage tissulaire accru. Cette étude constitue à notre connaissance une des premières évidences suggérant que la vulnérabilité mitochondriale au stress puisse se développer de manière précoce au cours de l'hypertrophie compensée et pourrait ainsi contribuer au déclenchement de la mort cellulaire apoptotique et à l'apparition des dysfonctions mitochondriales sévères qui sont typiquement observées lorsque le cœur atteint le stade d'insuffisance.

De plus, en comparant l'effet de la fistule aorto-cavale chez les rats WKHA à celui décrit dans la littérature chez le rat de souche Sprague Dawley (SD), nous avons constaté que ce dernier semblait beaucoup plus susceptible à une progression vers la décompensation cardiaque. En effet, aucune mortalité n'est observable avant la trente-deuxième semaine post-chirurgie chez le rat WKHA alors que certaines études ont fait état d'un taux de mortalité de 50 % à la douzième semaine post-chirurgie chez le rat SD (40, 87). La troisième étude de cette thèse qui sera soumise pour publication dans *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* sous peu, avait comme objectif de vérifier si la progression plus rapide de la pathologie chez le Rat SD était liée à un développement plus rapide et plus important de la vulnérabilité mitochondriale au stress comparativement au rat WKHA. Les résultats ont montré qu'une fistule aorto-cavale affecte de façon différente les rats SD et WKHA, induisant un remodelage plus rapide chez le Rat SD. De plus, les taux de morbidité et de mortalité en réponse à la fistule sont significativement plus élevés

chez le Rat SD, suggérant une susceptibilité accrue à la décompensation cardiaque dans cette souche. En réponse à la surcharge volémique, la fonction contractile lors de l'ischémie-reperfusion est altérée dans les deux souches de rats comparativement aux rats sham, mais l'altération apparaît plus rapidement dans la souche SD. Toutefois, aucune différence significative n'est observable quant au niveau d'ouverture du PTP *in vivo* ou *in vitro* entre les deux souches suggérant que la susceptibilité mitochondriale au stress n'explique pas les différentes susceptibilités à la décompensation.

## **1. Revue de littérature**

### **1.1. Introduction**

En 1999 au Canada, 36% des décès ont été attribués à une maladie cardiovasculaire, en faisant ainsi la principale cause de décès au pays. Les maladies cardiovasculaires sont aussi la plus importante cause d'hospitalisation (18% de l'ensemble des hospitalisations) et entraînent le plus important fardeau économique de toutes les catégories de diagnostic avec un coût de 18,5 milliards de dollars en 1998 (45). La cardiopathie ischémique, aussi appelée insuffisance coronarienne, est la plus importante cause de décès parmi les maladies cardiovasculaires (54% des décès au Canada) et selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elle sera la principale cause de mortalité mondiale vers la fin de 2020 (202). De plus, près de la moitié de ces décès sont dus à un infarctus du myocarde durant la phase aiguë de la cardiopathie ischémique (45). Les maladies cardiovasculaires sont malheureusement difficiles à traiter : elles guérissent rarement et la maladie sous-jacente continue de progresser d'où l'importance de mesures préventives primaires et secondaires ainsi que de traitements appropriés pour diminuer la morbidité et la mortalité y étant associées (45). En effet, l'infarctus du myocarde entraîne un remodelage aigu du tissu cardiaque dû à la mort cellulaire par nécrose des cardiomyocytes, ce qui entraîne la formation d'une cicatrice au site de l'infarctus, mais aussi dans la région périphérique appelée la pénombre ischémique. Un remodelage chronique, dont l'étendue dépend de l'intensité du dommage, peut aussi s'étendre sur plusieurs mois et débute dans les jours qui suivent l'infarctus. Il est généralement associé à l'activation de réponses neuro-humorales et inflammatoires, à l'augmentation du stress oxydant ainsi qu'à la dilatation et l'hypertrophie ventriculaire, ces derniers étant en partie dus à la mort cellulaire par apoptose de cardiomyocytes présents dans le tissu sain avoisinant la cicatrice (1, 288). De plus, on estime que 30 à 40% des patients ayant subi un infarctus du myocarde développeront par la suite des problèmes de défaillance cardiaque, qui en est la complication la plus fréquente (1, 302).

Il a été proposé que la mitochondrie puisse jouer un rôle important dans la pathogénèse du dommage ischémique via l'activation de la voie apoptotique intrinsèque ou de l'ouverture d'un pore non-spécifique de la membrane interne mitochondriale, le pore de perméabilité transitionnelle (PTP) dont l'implication dans la mort cellulaire tant nécrotique qu'apoptotique est maintenant bien documentée (103, 107, 280). De plus, il a été suggéré que ces phénomènes aient lieu lors de la pathogénèse de la défaillance cardiaque et qu'ils contribuent au remodelage ventriculaire pathologique et à la perte de cardiomyocytes entraînant l'évolution vers la décompensation cardiaque. Ainsi, on retrouve dans la littérature un bon nombre d'évidences montrant la détérioration de la fonction mitochondriale et la production accrue de radicaux libres au niveau du cœur défaillant. Cette augmentation de la production de radicaux libres par la mitochondrie a été suggérée comme un facteur important de l'évolution de la défaillance cardiaque puisqu'ils ont de nombreux effets délétères au niveau de la fonction même de la mitochondrie et de l'intégrité de l'ADN mitochondrial et qu'ils activent les métalloprotéinases matricielles responsables de la destruction des fibres collagènes du compartiment extracellulaire, ce qui contribuerait au remodelage ventriculaire (264, 290).

Par ailleurs, des études épidémiologiques montrent que l'exercice régulier diminue non seulement la mortalité et la morbidité associées à la cardiopathie ischémique, mais qu'il diminue l'incidence d'un infarctus du myocarde chez une population physiquement active comparativement à une population sédentaire (200, 216, 253, 260, 265) en plus d'augmenter le taux de survie suite à un infarctus du myocarde dans l'éventualité où il surviendrait (200). De plus, chez des patients atteints de défaillance cardiaque, l'exercice régulier contribue à améliorer leur qualité de vie en plus de réduire les taux de mortalité et de morbidité (296, 304). Bien entendu, l'exercice régulier entraîne des bénéfices systémiques considérables tels qu'une diminution de la pression artérielle, du diabète de type II et de l'obésité ainsi qu'une amélioration du profil lipidique et de la fonction endothéliale qui peuvent contribuer à améliorer la santé cardiovasculaire (260). Par contre, des études utilisant le modèle du cœur perfusé ou d'occlusion de l'artère coronaire gauche *in vivo* chez



l'animal, ont permis d'associer plus précisément l'effet cardioprotecteur de l'exercice à une meilleure résistance aux dommages induits par l'ischémie-reperfusion. Différents mécanismes impliquant la mitochondrie ont été proposés (e.g. amélioration du potentiel antioxydant, augmentation du contenu en protéines chaperonnes (HSP; *heat shock proteins*), amélioration de la dynamique calcique, augmentation du ratio Bcl-2/Bax) et seront décrits dans cette revue de littérature qui sera segmentée en quatre parties principales.

La première section sera dédiée à la description de l'apoptose et de la nécrose et plus particulièrement au rôle joué par la mitochondrie dans ces deux types de mort cellulaire qui sont impliqués, tel que mentionné précédemment, dans la pathogénèse de la cardiopathie ischémique, de l'infarctus du myocarde et de la défaillance cardiaque. Dans cette section, le rôle du pore de perméabilité transitionnelle sera présenté de façon détaillée puisque sa régulation se trouve au centre des trois études faisant l'objet de cette thèse. La deuxième section portera sur le rôle des mitochondries et du PTP dans le dommage ischémique alors que la troisième section portera sur l'effet cardioprotecteur d'une hypertrophie physiologique et, de façon plus générale, de l'exercice. Cette section approfondira les mécanismes proposés dans la littérature pour expliquer cet effet bénéfique. Finalement, la dernière section portera sur le remodelage ventriculaire pathologique observé dans la maladie cardiovasculaire et particulièrement sur la dysfonction mitochondriale observée dans ce contexte.

## 1.2. Mort cellulaire et mitochondrie

*The mitochondrion is not only the cell's powerhouse, it is also its arsenal*  
(122)

La mitochondrie joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire par ses fonctions dans la production d'énergie (261), la régulation des concentrations intracellulaires de calcium (98, 230, 237, 245) et la production de radicaux libres qui participent à la signalisation cellulaire tant en conditions physiologiques que pathologiques (48, 77, 276). Le cœur est un tissu hautement oxydatif avec, en conditions normoxiques, environ 90% de son métabolisme sous forme aérobie grâce à la grande quantité de mitochondries (25 à 35 % du volume total du cardiomyocyte) (270). Contrairement au muscle squelettique, le muscle cardiaque est caractérisé par une impressionnante stabilité métabolique : une augmentation, même substantielle, de la consommation d'oxygène proportionnellement à une augmentation de la charge de travail imposée au cœur ne modifiera pas de façon importante le ratio créatine/phosphocréatine (243). Le renouvellement des réserves énergétiques par la mitochondrie est rendu possible grâce à l'oxydation phosphorylante, processus par lequel le gradient de proton généré par le fonctionnement des quatre complexes de la chaîne respiratoire agit comme force motrice pour la synthèse d'ATP ((192, 193) cités dans (162))(Figure 1).

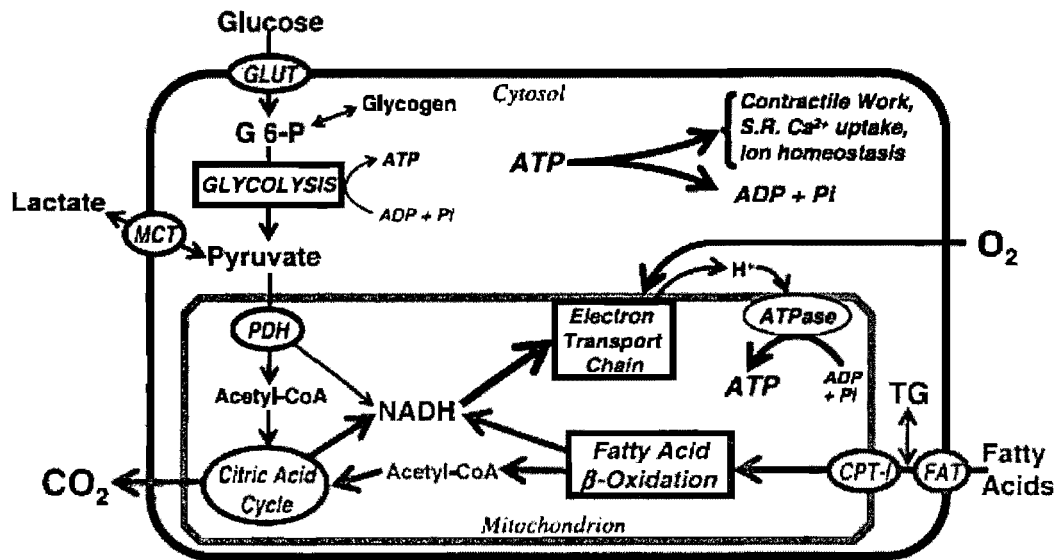


Figure 1. Schématisation des voies métaboliques au niveau du cœur. La mitochondrie abrite les enzymes de la  $\beta$ -oxydation, du cycle de Krebs, ainsi que la chaîne respiratoire et l'appareil de phosphorylation. L'oxydation complète du pyruvate et des acides gras fournit l'énergie redox requise pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire sous la forme de NADH (et  $\text{FADH}_2$ ). L'expulsion de proton dans l'espace inter-membranaire suivie de leur réentrée passive dans la matrice par l'ATP synthase permet la synthèse de l'ATP. Tiré de (275).

Toutefois, il est maintenant très bien accepté que la mitochondrie joue aussi un rôle dans la régulation de la mort cellulaire puisqu'elle possède la capacité de déclencher l'apoptose et la nécrose. Ces deux formes de mort cellulaire ainsi que la façon dont les mitochondries les déclenchent sont abordées ci-bas.

### 1.2.2. Nécrose

La nécrose est souvent définie de manière négative c'est-à-dire en la décrivant comme un type de mort cellulaire qui n'est ni de l'apoptose ni de l'autophagie (161). Hormis dans quelques rares cas de manifestations physiologiques (e.g. la dégradation de l'endomètre lors des menstruations chez l'Homme (168)), la nécrose est surtout considérée comme le résultat pathologique ou accidentel d'une catastrophe bioénergétique (78). Elle survient généralement dans les 2 à 4 heures qui suivent l'atteinte cellulaire (selon la sévérité de l'attaque) et est caractérisée par la déplétion des réserves d'ATP provoquant l'arrêt des pompes ioniques de la membrane plasmique. Subséquemment, la perméabilité de la membrane plasmique augmente, la cellule se gonfle (oncoose), les organelles, particulièrement les mitochondries, enflent et la membrane plasmique forme des prolongements en bulle (*blebbing*) avant de se rompre et de libérer ainsi des enzymes, des intermédiaires métaboliques et des facteurs pro-inflammatoires dans l'espace interstitiel ce qui endommage les cellules voisines (92, 168, 184)(Figure 2). Anciennement vue comme une conséquence purement accidentelle d'un stress non-physiologique subi par la cellule, il a été récemment proposé que, si l'attaque subie n'est pas d'intensité démesurée, la nécrose pourrait être un processus finement organisé (78, 92) dans lequel les étapes suivantes auraient lieu de manière relativement chronologique : dysfonction mitochondriale, augmentation de la production de radicaux libres, déplétion des réserves cellulaires d'ATP, défaillance des processus de gestion intracellulaire du calcium, regroupement des organelles près du noyau, activation des calpaïnes (protéases calcium-dépendantes), scission calpaïne-dépendante du cytosquelette, rupture des membranes lysosomales et libération des cathepsines (protéases lysosomales). Globalement, cette séquence d'événement mène à une fragmentation des constituants cellulaires, à la pyknose et la karyolyse (184, 292) ainsi qu'à la rupture de la membrane cellulaire (92).

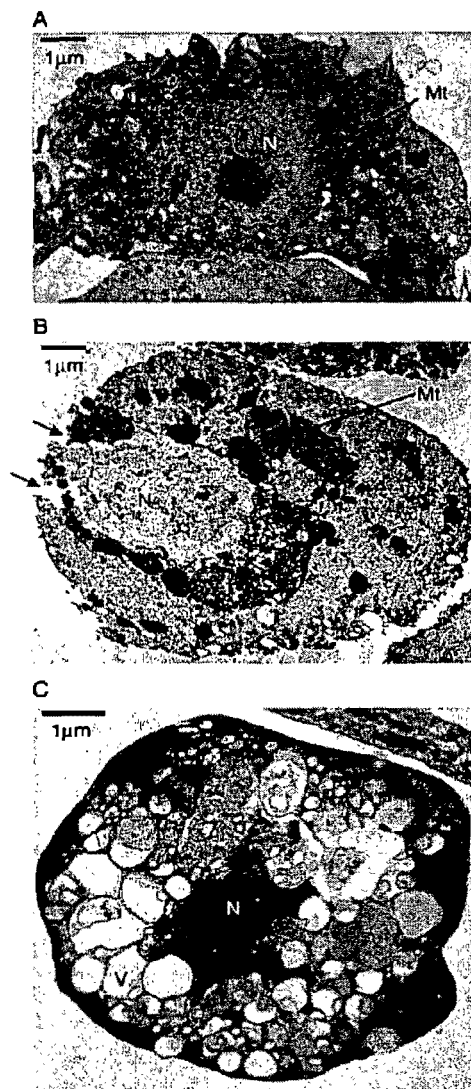


Figure 2. Caractéristiques ultrastructurales de l'apoptose et de la nécrose d'un cardiomyocyte.

Micrographie électronique d'un cardiomyocyte normal (A), traité pendant 24h avec du peroxyde d'hydrogène ( $200\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ )(B) ou pendant 24h avec de la doxorubicine ( $2\mu\text{M}$ ) (C). En (B) on peut observer des changements typiques de la nécrose : mitochondries gonflées, rupture de la membrane plasmique (indiquée par des flèches). En (C), le cardiomyocyte montre plutôt des signes d'apoptose avec une diminution du volume du cytoplasme, une membrane plasmique intacte, la condensation du noyau et la présence de multiples vacuoles. Mt : mitochondrie, N : noyau, V : vacuoles. Tiré de (46)

### 1.2.3. Apoptose

Probablement le type de mort cellulaire le plus étudié au cours des deux dernières décennies, l'apoptose est un phénomène contrôlé génétiquement. Le terme apoptose a été introduit en 1972 par J.F. Kerr (151) pour décrire un phénomène caractérisé par la conversion des cellules mourantes en petites masses circulaires contenant du cytoplasme, des organelles intactes ainsi que de multiples nucléosomes contenant des fragments d'ADN nucléaire (Figure 2). Ces auteurs ont également montré que ces masses, appelées corps apoptotiques, sont phagocytées et digérées par les cellules environnantes, ce qui contribue à distinguer cette forme de mort de la nécrose (152).

Les termes apoptose et mort cellulaire programmée (*programmed cell death; PCD*) sont souvent utilisés comme des synonymes. Cependant, même si les deux phénomènes font appel aux mêmes mécanismes d'activation et d'exécution cellulaire, ils n'en demeurent pas moins différents. En effet, la *PCD* fait référence au phénomène développemental normal au cours duquel certaines cellules sont appelées à disparaître (*i.e.* disparition du tissu interdigital, formation des cavités du corps ou élimination des structures vestigiales au cours du développement embryonnaire, stabilisation du réseau neuronal au cours de la maturation) (151, 183, 184, 242, 300). Au contraire l'apoptose est plutôt un programme de mort cellulaire utilisé par les organismes multicellulaires matures pour se débarrasser de cellules excédentaires (168) ou devenues potentiellement dangereuses suite à des mutations (300). Ce processus est nécessaire au bon fonctionnement des organes et différentes pathogénèses sont associées à des dérèglements menant à son inhibition ou à son hyperactivation.

Au cours des dernières années, un grand nombre d'études ont permis de mieux caractériser les étapes impliquées dans l'apoptose et d'identifier plusieurs protéines et voies de signalisation responsables de son déclenchement et de son exécution. L'apoptose peut être divisée en trois étapes distinctes : l'initiation, l'intégration ou la prise de décision et l'exécution ou la dégradation (162). La

première étape dépend du mécanisme d'initiation : la voie d'activation peut provenir de l'activation d'un récepteur membranaire (voie extrinsèque), de la mitochondrie (voie intrinsèque), du réticulum endoplasmique ou de l'activation d'une protéase appelée granzyme B (298). Les voies extrinsèque et intrinsèque sont les plus étudiées et les plus communément retrouvées dans la littérature traitant de l'apoptose en plus de pouvoir agir en synergie (voir les sections 1.2.3.2 et 1.2.3.3). La deuxième étape, pendant laquelle la décision de mourir est prise, est un point de non-retour. Dans la vaste majorité des cas étudiés, cette étape dépend de l'activation de protéases spécifiques appelées caspases (voir section 1.2.3.1). Finalement, la troisième et dernière étape est commune à toutes les voies d'activation : c'est un processus post-mortem au cours duquel on peut observer les caractéristiques morphologiques mentionnées précédemment et qui sont typiques de l'apoptose (161, 162, 292, 300) (Figure 2).

#### 1.2.3.1. Famille des caspases

Les caspases sont des protéases qui clivent les protéines après un résidu aspartate grâce à leurs résidus cystéine (*Cystein protease cleaving after Asp*). Elles ciblent certaines protéines qu'elles activent ou inactivent généralement par clivage, ce qui déclenche l'activation en cascade d'une multitude de sous-programmes dont la finalité sera la destruction organisée de la cellule (122). Généralement, leur rôle consiste à arrêter le cycle cellulaire et désactiver le processus de réparation de l'ADN en plus d'inactiver les protéines inhibitrices de l'apoptose (XIAP) présentes normalement dans la cellule et de démonter le cytosquelette (298). Les caspases sont présentes dans toutes les cellules sous leur forme inactive (procaspases) et elles sont activées par clivage protéolytique. La famille des caspases impliquée dans l'apoptose peut être divisée en deux sous-classes fonctionnelles d'enzymes : les caspases initiatrices (caspases -2, -8, -9 et -10) et les caspases effectrices (caspases -3, -6 et -7). Les autres caspases identifiées à ce jour chez l'Homme (caspases -1, -4, -5 et -13) sont impliquées dans le processus inflammatoire (315). Les caspases initiatrices sont

présentes à l'état latent dans la cellule et sont généralement activées par une autre procaspase située à proximité (les procaspases ayant un niveau d'activité enzymatique faible, mais suffisant pour l'activation de procaspases voisines), par une caspase située en amont dans la cascade de signalisation ou par l'association à d'autres protéines activatrices (315). L'activation d'une caspase initiateur engendre normalement une cascade de signalisation dont l'étape suivante est l'activation directe d'autres caspases initiateur (amplification du signal) et de caspases effectrices dont la fonction est le démantèlement cellulaire (122).

### 1.2.3.2. Voie extrinsèque

Une première voie menant à l'activation des caspases est la voie extrinsèque, aussi appelé la voie des récepteurs de mort (*death receptors*). Cette voie implique le recrutement de récepteurs transmembranaires de la superfamille du TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) par leurs ligands (298). Les récepteurs les mieux caractérisés de cette superfamille sont les récepteurs Fas et TNRF<sub>1</sub> dont les ligands sont le ligand de Fas (FasL) et TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ; une cytokine inflammatoire), respectivement (Figure 3)(242). Ces deux récepteurs sont constitués d'un site de liaison extracellulaire et d'un domaine cytoplasmique appelé domaine de mort (DD; *death domain*). Une fois recrutés, les récepteurs s'agglomèrent en complexes homotrimériques et peuvent alors recruter la procaspase-8 à la membrane plasmique grâce à la présence de protéines adaptatrices possédant aussi un DD. Ces protéines adaptatrice (FADD; *Fas associated death domain* ou TRADD; TNRF<sub>1</sub> *associated death domain*), possèdent également un domaine effecteur (DED; *death effector domain*) qui, en interagissant avec procaspase-8, permet son agrégation et sa co-activation. La caspase-8, une fois activée, peut convertir la procaspase-3 en caspase-3, une caspase effectrice (voir les revues de (242, 292, 315)).



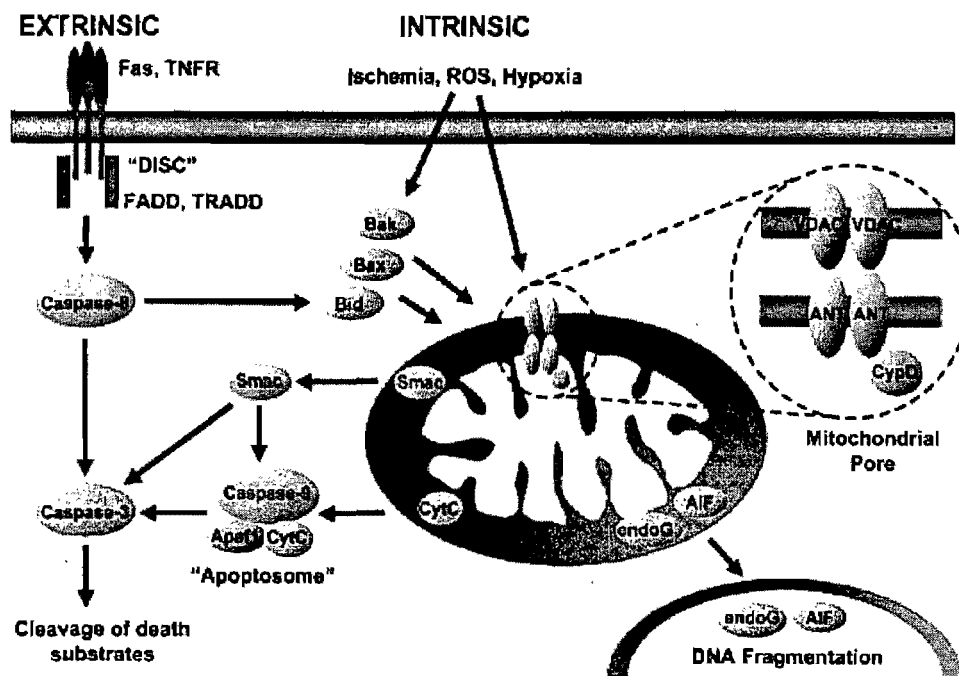


Figure 3. Représentation schématique des voies extrinsèque et intrinsèque pro-apoptotiques. Tiré de (21).

### 1.2.3.3. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque, aussi appelée la voie mitochondriale, est le mécanisme d'activation des caspases le plus commun chez les vertébrés (94). Dans une cellule subissant un stress génotoxique, la voie intrinsèque peut être activée suite à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et la sortie subséquente dans le cytosol de protéines normalement restreintes à l'espace inter-membranaire mitochondrial (IMS) dont plusieurs ont une action pro-apoptotique caspase-dépendante (cytochrome c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2) ou caspase-indépendante (AIF, EndoG). Ce phénomène peut survenir suite au recrutement de plusieurs protéines de la famille de Bcl-2 qui, en s'oligomérisant à la membrane externe (OM),

contribuent à former un pore et/ou suite à l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (Figure 3).

#### ***1.2.3.3.1. Perméabilisation de l'OM et famille de Bcl-2***

La famille de Bcl-2 est composée de plus d'une trentaine de protéines qui peuvent être divisées en 3 sous-groupes : 1) les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (e.g. Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub>, Bcl-w, Mcl-1), 2) les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bax (e.g. Bax, Bak) et 3) les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bik (e.g. Bid, Bad, Bim, Bnf, Puma, Noxa, BNip3, Nix)(90, 289). Les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 partagent une homologie à quatre domaines différents appelés *Bcl-2-homology* (BH 1 à 4). Toutefois, les protéines de la famille de Bax ne disposent que de 3 de ces domaines (BH1 à 3) et la majorité des autres protéines pro-apoptotiques ne possèdent que le domaine BH3 suggérant un rôle primordial de cette région dans l'action pro-apoptotique de ces protéines. Ces protéines sont capables de former des homodimères ou des hétérodimères et les protéines anti-apoptotiques exercent en partie leur inhibition en liant directement d'autres membres pro-apoptotiques de la même famille (90).

L'augmentation de perméabilité de l'OM est généralement causée par l'insertion dans la bicouche lipidique de Bax, une protéine cytosolique pro-apoptotique de la famille de Bcl-2, où elle forme une ouverture, seule ou en association avec d'autres protéines de la même famille (Bak, tBid). Une fois entrée dans l'OM, Bax peut former des pores homo-oligomériques ou déstabiliser la bicouche lipidique ce qui y crée des zones discontinues (162). Par ces pores nouvellement formés, les protéines contenues dans l'IMS peuvent sortir pour atteindre le cytosol, mais sans affecter l'IM. Le cytochrome c (cyt c), une protéine de 13 kDa habituellement localisée près de l'IM dans l'IMS où elle transporte les électrons du complexe III au complexe IV, est ainsi relâchée dans le cytosol. À cet endroit, cyt c interagit avec Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) ce qui permet, en présence de dATP ou d'ATP, le recrutement de plusieurs autres molécules

en un complexe protéique appelé apoptosome (177). L'introduction de la procaspase-9 dans l'apoptosome permet son activation en caspase-9, possiblement par un changement de conformation (122). La caspase-9 se dissocie ensuite du complexe pour aller activer les caspases effectrices -3 et -7. La relâche de cytochrome c est obligatoire à l'activation de ce processus, démontrant le rôle primordial de la perméabilisation des membranes mitochondriales dans la voie intrinsèque.

#### *1.2.3.3.2. Perméabilisation de l'IM et pore de perméabilité transitionnelle*

La deuxième modification que peut subir la mitochondrie soumise à un stress cellulaire est la perméabilisation de sa membrane interne. Ce phénomène est généralement attribué à l'ouverture d'un pore non-spécifique de grande conductance appelé pore de perméabilité transitionnelle (PTP). L'ouverture du PTP provoque une augmentation soudaine de la perméabilité de l'IM en ouvrant le passage aux solutés de moins de 1,5 kDa. La concentration en cations étant beaucoup plus élevée (de 2 à 3 logs) dans la matrice mitochondriale que dans le cytosol et l'OM étant relativement perméable, l'ouverture du PTP entraîne la création d'un gradient de pression osmotique de part et d'autre de l'IM et un déplacement d'eau vers la matrice mitochondriale qui la fait gonfler. Le gonflement se poursuit jusqu'à la rupture de l'OM qui permet la sortie des ions (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) et des nucléotides pyridiniques contenus dans la matrice ainsi que des protéines contenues dans l'IMS. Celles-ci sortent dans le compartiment cytosolique et permettent l'activation de la voie intrinsèque, tel que vu précédemment. De plus, l'augmentation de la perméabilité de l'IM entraîne un effondrement du  $\Delta\psi_m$  et une abolition de la synthèse d'ATP. La perte des nucléotides pyridiniques et des substrats respiratoires du complexe I inhibe quant à elle la respiration. En l'absence d'un gradient de proton, l'activité de la  $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$  s'inverse et celle-ci commence à hydrolyser l'ATP cytosolique (28, 30, 61, 103, 280). Par ailleurs, une fois dans le cytosol, le cyt c provoque une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium en levant l'inhibition du

récepteur IP<sub>3</sub> du réticulum endoplasmique (32). De plus, la relâche de cyt c nuit au fonctionnement normal de la chaîne respiratoire, ce qui favorise la production de radicaux libres (ROS) et la dysfonction mitochondriale (314). Ces phénomènes provoquent donc un cercle vicieux de dysfonction en stimulant l'ouverture du PTP dans un nombre croissant de mitochondries menant éventuellement à la mort cellulaire.

#### 1.2.3.3.3. *Relâche mitochondriale de facteurs pro-apoptotiques*

En plus du cyt c, plusieurs autres protéines s'échappent de l'IMS lorsque la perméabilité de l'OM augmente. C'est le cas notamment de l'AIF (*apoptosis-inducing factor*) et de l'endonucléase G (EndoG), deux protéines qui migrent vers les noyaux cellulaires. L'AIF induit directement la condensation de la chromatine et provoque le clivage des brins d'ADN en activant la cyclophiline A, une ADNase latente (281), tandis que l'endoG participe au clivage de l'ADN en fragments nucléosomaux (174). L'action endonucléotique de ces protéines semble dans une large mesure caspase-indépendante puisqu'elle n'est pas affectée par l'ajout d'inhibiteurs des caspases. Le Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP) binding protein with low pI*) et l'Omi/HtrA2 (*Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2*) sont également relâchés par les mitochondries. Ces deux protéines exercent leur action apoptotique en neutralisant les IAP, des protéines qui inhibent normalement les procaspases, bien que Smac/DIABLO puisse aussi activer directement la caspase-3 (Figure 3)(voir la revue de (162)). Finalement, quelques procaspases (procaspases-2, -3, -8 et -9) résideraient également dans l'IMS et seraient relâchées dans le cytosol suite à la perméabilisation membranaire.

#### **1.2.3.3.4. Interaction entre les voies extrinsèque et intrinsèque**

La voie intrinsèque peut aussi être stimulée par l'activation de la voie extrinsèque, illustrant bien l'intégration des deux systèmes de signalisation. La caspase-8 peut en effet cliver la protéine cytosolique Bid en tBid (*truncated Bid*) (voir section 1.2.3.3.1), ce qui permet sa translocation vers la mitochondrie où elle participe au recrutement et à l'oligomérisation de Bax (162, 292).

#### **1.2.4. Pore de perméabilité transitionnelle (PTP)**

##### **1.2.4.1. Identité moléculaire**

Dans les années 50, le gonflement des mitochondries isolées *in vitro* avait été observé en présence d'une concentration élevée de calcium et ce phénomène pouvait être inhibé par l'ajout de nucléotides adényliques ou d'agents découplants (58, 181, 239). Premièrement associée à un dommage membranaire dû à l'activation des phospholipases A2 calcium-dépendantes (PA2) (316), ce phénomène a par la suite été attribué par Hunter et Haworth à la formation d'un pore protéique dans la membrane interne, le PTP. Ces auteurs ont montré que la transition de perméabilité a lieu dans un mode de tout-ou-rien, que le calcium est un élément déclencheur obligatoire et que ce phénomène peut être inhibé par la présence de substrats respiratoires, d'ADP, de NADH et de  $Mg^{2+}$  endogènes (117, 118, 124-126). D'abord considérés comme artéfactuels, ces résultats ont par la suite été reconnus et bonifiés par le groupe de Crompton qui a montré que l'agent immunosuppresseur cyclosporine A (CsA) peut moduler (4, 5, 62-65) ou inhiber la transition de perméabilité (65). Le fait que la CsA n'exerce aucun effet inhibiteur sur la PA2 a par ailleurs grandement contribué à invalider l'hypothèse du dommage membranaire non-spécifique dans ce phénomène (317). Finalement, un pore de large conductance (« *mega channel* ») affichant des propriétés régulatrices similaires à celles décrites sur mitochondries isolées a ensuite été identifié à l'aide d'expériences électrophysiologiques sur mitoplastes (154, 223). Pour une revue plus détaillée, voir les revues de littérature (316, 317).

La découverte du PTP a ouvert la voie à une caractérisation plus précise de sa structure. Cependant, son identité moléculaire demeure encore à ce jour un sujet de vifs débats. L'hypothèse suggérée initialement est que le pore soit constitué d'un complexe formé de protéines intrinsèques aux deux membranes mitochondriales et de certaines protéines de l'espace intermembranaire. Ces protéines s'assembleraient en un complexe d'environ 600 kDa préférentiellement aux points de contact entre les deux membranes. Les principaux composants présumés du PTP sont la cyclophiline D (CypD; dans la matrice), le transporteur des nucléotides adényliques (ANT; IM) et le canal porine (VDAC; OM) auxquels viendraient s'associer plusieurs protéines incluant l'isoforme mitochondrial de la créatine kinase (MiCK; IMS), le récepteur périphérique à la benzodiazépine (PBR; OM) et l'hexokinase lorsqu'elle est associée à VDAC (HK; cytosol) (Figure 4). Des études récentes menées à l'aide de stratégies transgéniques ont toutefois mis en évidence l'insuffisance de ce modèle. En effet, ces études ont montré l'existence d'une transition de perméabilité malgré l'inactivation des gènes de la cyclophiline D (19, 23, 203), des trois isoformes de l'ANT (157) et de VDAC (20). Bien que ces études suggèrent que ces protéines ne soient pas les seules à pouvoir former le PTP, il n'en demeure pas moins que leur absence affecte la sensibilité du PTP. En effet, en absence de cyclophiline D et d'ANT, l'ouverture du PTP s'avère significativement plus difficile. Chez les souris n'exprimant pas la cyclophiline D, ce phénomène se traduit notamment par une grande résistance à la mort cellulaire induite par l'ischémie-reperfusion et le stress oxydant (19, 23, 203).

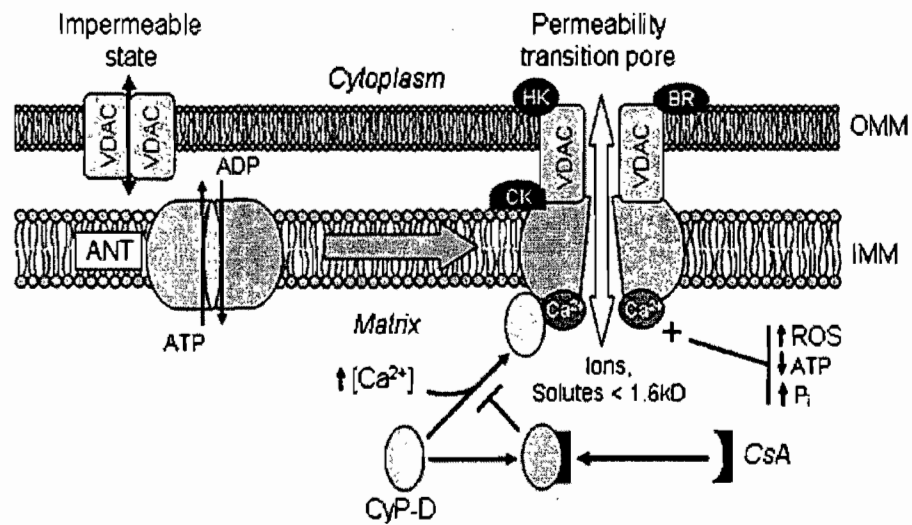


Figure 4. Pore de perméabilité transitionnelle.

Les composants putatifs du PTP sont la cyclophiline D (CyPD), le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) et le canal porine (VDAC) auxquels s'ajouteraient la créatine kinase (CK), le récepteur périphérique à la benzodiazépine (PBR) et l'hexokinase lorsqu'elle est associée à VDAC (HK). IMM : membrane interne mitochondriale, OMM : membrane externe mitochondriale, ROS : radicaux libres, CsA : cyclosporine A. Tiré de (139).

#### ***1.2.4.2. Régulation de l'ouverture du PTP***

Le pore de perméabilité transitionnelle mitochondrial peut osciller rapidement entre une conformation ouverte et fermée ou demeurer ouvert de façon prolongée. Plusieurs degrés d'ouverture sont observés allant de faible à haute conductance. De plus, deux modes d'ouverture ont été proposés soit un mode régulé calcium-dépendant et un mode non-réglé calcium-indépendant (12, 120, 251).

L'ouverture transitoire à faible conductance, normale dans une cellule saine, pourrait permettre l'échange de métabolites (e.g. calcium, ATP, ADP) entre le cytosol, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. De plus, une ouverture transitoire de haute conductance permet l'équilibration rapide des solutés de moins de 1500 Da, ce qui pourrait contribuer à l'homéostasie mitochondriale en équilibrant la composition ionique matricielle à celle du cytoplasme (37, 162).

Toutefois, une ouverture prolongée à haute conductance semble avoir des conséquences néfastes pour la cellule. Il a été récemment proposé que l'ouverture transitoire du PTP puisse entraîner la mort apoptotique en permettant la relâche de cyt c, mais non la déplétion des réserves d'ATP tandis qu'une ouverture prolongée, provoquée par un dommage plus important à la cellule, entraînerait la déplétion des réserves énergétiques cytosoliques et la nécrose cellulaire (12, 102). Toutefois, il a aussi été montré qu'une ouverture prolongée peut s'avérer nécessaire à la sortie de cytochrome c de l'IMS (222). En effet, le cyt c étant normalement séquestré dans l'espace inter-cristae, la perméabilisation de l'OM ne permet de faire sortir qu'environ 15% du contenu en cyt c de la mitochondrie. Toutefois, l'ouverture prolongée du PTP entraîne un gonflement de l'IMS et un dépliement des cristae, permettant à la majeure partie du cyt c de s'en échapper (72). De plus, ce serait plutôt la quantité d'ATP disponible dans la cellule qui déterminerait le type de mort cellulaire subie. Dans un contexte d'apoptose, la présence d'ATP (ou de dATP) est



requis pour assurer la formation de l'apoptosome ainsi que pour l'activation de certaines kinases (51, 269). Par contre, si l'inhibition de la production (ou la déplétion des réserves d'ATP) a lieu dans les 90 minutes suivant l'exposition à un stimulus mortel, la cascade apoptotique déclenchée par la relâche de cytochrome c, est remplacée par une cascade nécrotique. Toutefois, une cellule engagée dans la voie de la nécrose peut être sauvée si on lui fournit de l'ATP dans les 120 minutes suivant le début du dommage (167). La diminution de la quantité d'ATP cytosolique nuit au fonctionnement des pompes ioniques ATPases et entraîne une perturbation de la gestion de la concentration de calcium intracellulaire. Une augmentation de la concentration de calcium cytosolique peut par ailleurs accélérer l'ouverture du PTP (et subséquemment l'utilisation d'ATP cytosolique) dans une population encore plus grande de mitochondries et peut permettre l'activation d'une série de protéases et d'endonucléases calcium-dépendantes, dont les calpaïnes, qui procéderont à la destruction des constituants cellulaires dans un mode de mort cellulaire nécrotique (90, 92). Quoiqu'il en soit, l'ouverture prolongée du PTP entraîne l'activation de voies de mort cellulaire et représente donc un événement néfaste pour la survie cellulaire.

#### *1.2.4.2.1. Ouverture régulée du PTP*

Selon l'hypothèse la mieux documentée, l'ouverture du PTP nécessite l'accumulation de calcium dans la matrice mitochondriale et sa liaison à des sites spécifiques sur les constituants présumés du PTP (Figure 5). En effet, l'ouverture du PTP est empêchée par l'ajout de rouge de ruthénium ou d'EGTA à une préparation de mitochondries isolées. Le premier empêche l'entrée de calcium dans la matrice en inhibant l'uniporteur de calcium et le second, en chélatant le calcium avant son entrée dans la mitochondrie. Toutefois, même si la présence de calcium semble suffisante pour déclencher l'ouverture du PTP, une multitude d'agents sont capables d'accélérer ou de ralentir (voire d'inhiber) ce phénomène. La présence de phosphate inorganique (Pi) accélère, en présence de fortes concentrations de calcium, la transition vers la

conformation ouverte du PTP en augmentant l'entrée du calcium dans la matrice ainsi qu'en contribuant soit à dépléter le pool matriciel de nucléotides adényliques soit à tamponner le pH matriciel (126, 127, 220, 316). En effet, un pH matriciel alcalin favorise l'ouverture du PTP tandis qu'un pH acide l'inhibe (29, 209).

De plus, le PTP agit comme un canal voltage-dépendant régulé par le gradient électrochimique établi de part et d'autre de l'IM. En effet, le PTP est sensible aux variations physiologiques du potentiel de membrane mitochondrial (entre 120 et 180 mV), une diminution de  $\Delta\psi_m$  favorisant la conformation ouverte (29, 220, 252). Cette régulation semblerait attribuable à la présence d'au moins un résidu histidine du côté matriciel et de deux résidus cystéines qui agiraient comme senseurs (221). Ainsi, les agents oxydants qui convertissent les groupements thiols des résidus cystéines (senseurs) en ponts disulfures, modifient la sensibilité du PTP au voltage à un premier site et facilitent la transition vers la conformation ouverte (221). L'oxydation des réserves de nucléotides pyridiniques (NADH et NADPH) favorise également l'ouverture du PTP en modulant un deuxième site du senseur (12). D'ailleurs, le stress oxydant peut contribuer à la diminution du contenu en nucléotide pyridiniques, et donc à l'ouverture du PTP, puisque le pool de glutathion, dont l'oxydation constitue un système de défense de première importance dans la mitochondrie, est en équilibre redox avec le pool de NADPH (50, 159).

Par ailleurs,  $\Delta\psi_m$  étant maintenu par la phosphorylation oxydative, tous les agents découplants (e.g. FCCP, CCCP, DNP, acides gras) favorisent l'ouverture du PTP dans la mesure où une quantité suffisante de  $\text{Ca}^{2+}$  est déjà présente dans la matrice (221, 316).

Les ligands du transporteur des nucléotides adényliques (ANT), un constituant présumé du PTP, peuvent aussi avoir un effet modulateur sur l'ouverture du PTP. En

effet, l'atractyloside, favorise l'ouverture du PTP en bloquant l'ANT lorsque ses sites de liaison font face au cytosol (106), tandis que l'acide bongkréique (BA) inhibe le PTP en bloquant l'ANT lorsque ses sites de liaison font face à la matrice (124). Les nucléotides adényliques ADP et ATP inhibent aussi l'ouverture du PTP en se liant directement avec l'ANT (110, 117).

Tel que mentionné précédemment, l'agent immunosuppresseur cyclosporine A (CsA) et ses analogues empêcheraient la formation du complexe multi-protéique du PTP en se liant avec la cyclophiline D dans un mode de compétition avec le calcium (38, 65, 82, 316). De plus, l'effet du calcium peut être contré par la présence d'autres cations bivalents tels que  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Ba^{2+}$  qui pourraient être des compétiteurs pour les sites de liaison de  $Ca^{2+}$  (31, 118, 316). Finalement, il a aussi été proposé que la présence de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>) puisse favoriser la conformation fermée tandis que les protéines pro-apoptotiques de la même famille (Bax, Bak, Bid) pourraient agir comme facilitateurs (voir l'article de synthèse (162))

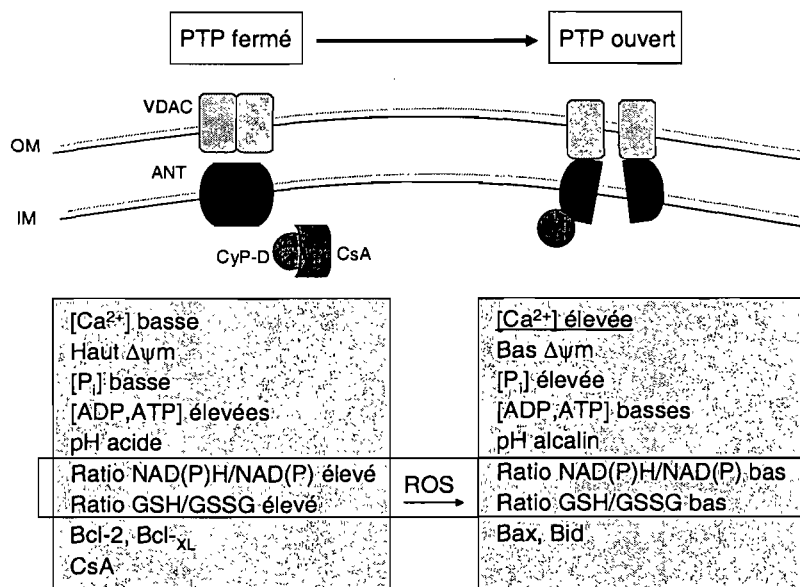


Figure 5. Résumé des principaux facteurs qui régulent l'état d'ouverture du PTP. CyP-D : cyclophiline D, CsA : cyclosporine A,  $\Delta\psi_m$  : potentiel de membrane mitochondriale, GSSG : glutathion oxydé, GSH : glutathion réduit, IM : membrane interne mitochondriale, OM : membrane externe mitochondriale, P<sub>i</sub> : phosphate inorganique.

#### ***1.2.4.2.2. Ouverture non-régulée du PTP***

D'autre part, Scorrano et al. (252) ont proposé en 1997 l'existence d'un mode non-régulé d'ouverture du PTP suggérant l'existence d'un phénomène dans lequel un dommage mitochondrial entraînerait la perméabilisation de l'IM. Puis, en 2002, He et Lemasters (120) ont proposé l'hypothèse selon laquelle dans le mode d'ouverture non-régulé, le pore serait formé par des protéines membranaires ayant été abimées par un stress oxydant ou par un autre type de dommage. Dans cette situation, les protéines endommagées formeraient des agrégats qui laisseraient passer de manière non-spécifique les solutés à travers l'IM en formant un canal, grâce à l'exposition de leurs résidus hydrophiles (Figure 6)(120). Dans ce modèle, les protéines chaperonnes, dont la cyclophiline D, pourraient se lier à l'agrégat de protéines endommagées, empêchant ainsi le passage de solutés par le canal. Sous l'effet d'une forte concentration de calcium, le complexe formé précédemment serait toutefois perturbé et libérerait le canal. Cet effet pourrait être antagonisé par la CsA tant et aussi longtemps que le nombre d'agrégats ne dépasse pas en nombre la cyclophiline D disponible (120). Cette théorie ne fait pas l'unanimité (81), mais pourrait toutefois contribuer à expliquer la formation de pores qui ne répondent pas à l'effet de la CsA, particulièrement en conditions où les stress oxydant et calcique sont augmentés (317).

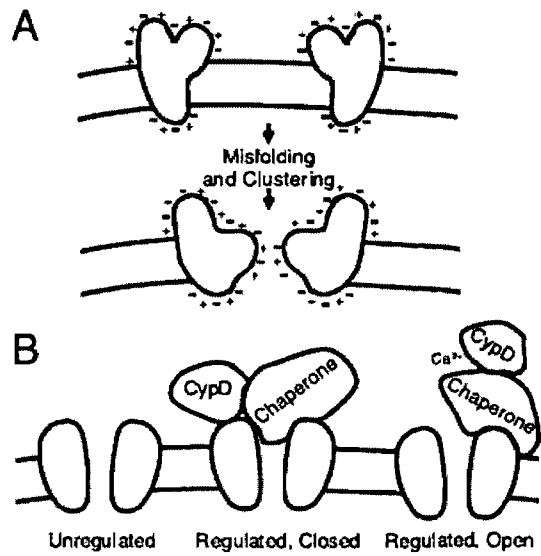


Figure 6. Schéma illustrant l'hypothèse de l'ouverture non-réglée du pore de perméabilité transitionnelle. Tiré de (120).

### 1.3. Dommage ischémique : rôle des mitochondries et du PTP

L'ischémie cardiaque se caractérise par une interruption partielle ou complète de l'approvisionnement sanguin dans une région du myocarde. La sévérité des dommages induits par la pénurie en substrats énergétiques et en oxygène dépend de la superficie et de la localisation de la région atteinte ainsi que de la durée de l'ischémie. Il est par ailleurs bien connu que le rétablissement de la perfusion coronaire dans les régions ischémiques contribue, de manière paradoxale, au dommage cardiaque et ce d'autant plus que la période d'ischémie aura été sévère. Généralement, une courte période ischémique (1 à 5 minutes) provoque une tachycardie ventriculaire ou une période de fibrillation sans qu'un dommage permanent ne s'installe. Par ailleurs, une période d'ischémie plus longue (5 à 20 minutes) entraîne fréquemment un phénomène d'hibernation (*stunning*), caractérisé par une diminution de la contractilité. Toutefois, l'hibernation n'est pas accompagnée d'une perte cellulaire nécrotique ni apoptotique très marquée. Ce n'est généralement que lorsque la période d'ischémie est poursuivie au-delà de vingt minutes que la nécrose et l'apoptose sont activées et ce, durant l'ischémie ou au moment de la reperfusion, donnant lieu à une perte irréversible des cardiomyocytes et à un infarctus (228).

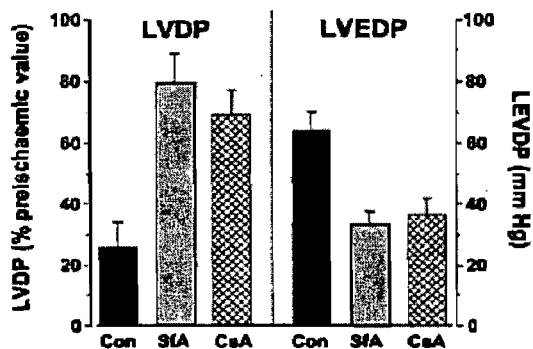
Il est maintenant bien établi que l'ouverture du PTP contribue de manière significative aux dysfonctions contractiles et à l'activation de la mort cellulaire dans le cœur soumis à une ischémie de cette durée. Ainsi, l'utilisation de la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur de l'ouverture du PTP, retarde l'apparition des signes de nécrose (207) et d'apoptose (306) suite une anoxie-réoxygénation *in vitro* de cardiomyocytes isolés. De plus, la CsA améliore la récupération fonctionnelle de cœurs isolés soumis à une ischémie-reperfusion (IR) (55, 96, 105) (Figure 7) et diminue la taille de l'infarctus suite à une occlusion de l'artère coronaire (11, 116,

été attribués à la SangliffehrinA (SfA) et à NIM811, deux analogues de CsA qui inhibent l'ouverture du PTP, mais qui n'ont pas d'effet immunosuppresseur, supportant l'idée que c'est réellement l'inhibition du PTP qui entraîne l'effet bénéfique observé (11, 55, 140). Qui plus est, chez les souris transgéniques n'exprimant pas la CypD (la cible de la CsA), le dommage ischémique et la nécrose suite à la reperfusion sont diminués, renforçant le rôle du PTP dans ces phénomènes (19, 203).

D'autre part, le développement de la méthode de séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]2-deoxyglucose ([<sup>3</sup>H] DOG) par le groupe de Halestrap (95, 104) a permis d'obtenir une mesure directe de l'ouverture du PTP dans le cœur isolé soumis à une IR. Leurs travaux ont permis de montrer que le PTP demeure fermé durant l'ischémie (95), mais que son ouverture est rapidement activée dès les premiers instants de la période de reperfusion (Figure 8)(104). Des résultats similaires ont aussi été obtenus par Di Lisa et al. (73), en mesurant la relâche de NAD<sup>+</sup> mitochondrial suite à une IR dans un cœur perfusé.



a)



b)

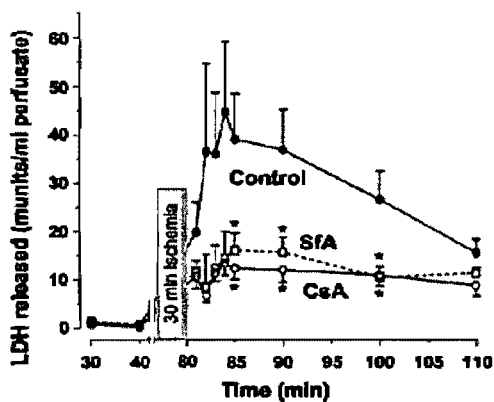


Figure 7. La CsA et la SfA protègent le cœur ischémié du dommage induit lors de la reperfusion. a) L'ajout de CsA ou de SfA entraîne une meilleure récupération fonctionnelle après 30 minutes de reperfusion, tel que mis en évidence par une meilleure préservation de la pression développée par le ventricule gauche (LVDP) et une pression télédiastolique plus faible (LVEDP). Les valeurs de LVDP sont significativement plus grandes et celles de LVEDP sont significativement plus basses avec CsA et SfA comparées à celles du groupe contrôle ( $p < 0.001$ ). b) CsA et SfA diminuent la relâche de la lactate déshydrogénase (LDH) suggérant une incidence moindre de mort nécrotique. \*  $p < 0.05$  pour CsA ou SfA comparé au groupe contrôle. Tiré de (55)

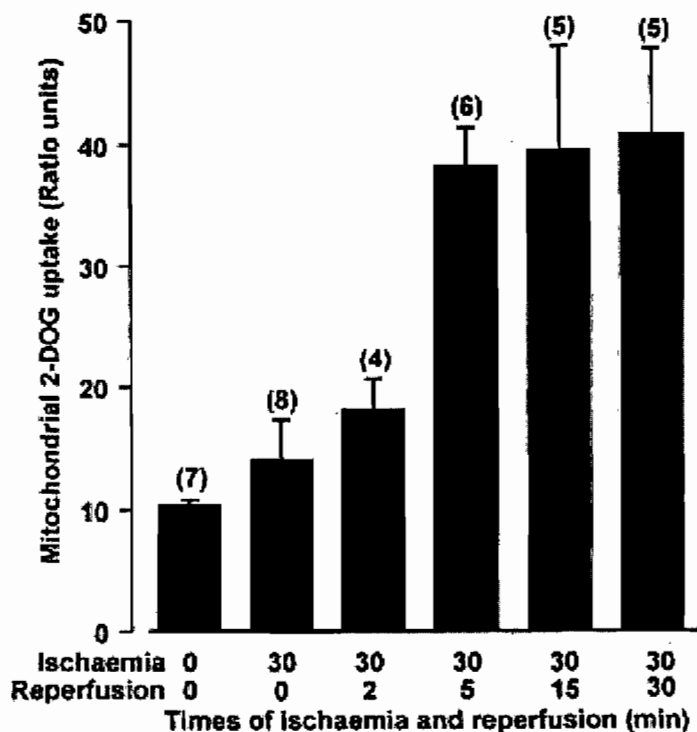


Figure 8. Séquestration mitochondriale de déoxyglucose lors de la reperfusion suite à une période d'ischémie de 30 minutes. L'ouverture du PTP est maximale après 5 minutes de reperfusion. Tirée de (108).

L'ouverture du PTP n'a pas lieu durant l'ischémie, mais la durée de celle-ci influence toutefois l'importance des dommages observés lors de la reperfusion. En effet, une période ischémique de 10 minutes entraîne une ouverture significative du PTP au cours de la reperfusion sans qu'il n'y ait de dommage irréversible du cardiomyocyte (10, 95). Toutefois, l'augmentation de la période ischémique provoque l'ouverture du PTP dans une plus grande fraction des mitochondries au sein de chaque myocyte, ainsi que dans un plus grand nombre de myocytes.

D'ailleurs, plusieurs phénomènes enclenchés au cours de l'ischémie et/ou de la reperfusion contribuent à augmenter la probabilité d'ouverture du PTP dans le coeur. Au cours de la période d'ischémie, l'absence d'oxygène engendre un arrêt rapide de la chaîne respiratoire, entraînant une perte partielle ou totale de la force proton-motrice (270). Ceci donne lieu à une diminution rapide et importante du contenu tissulaire en ATP et en phosphocréatine ainsi qu'une accumulation d'ADP, de Pi et d'ions  $H^+$  et ce, malgré la stimulation de la production d'ATP par la glycolyse anaérobie (141, 146, 270). L'accumulation d'ADP provoque quant à elle une augmentation de sa dégradation successive en IMP, en adénosine, en inosine puis en xanthine, menant ultimement à une perte du contenu tissulaire en nucléotides adényliques (35, 146). Cette interruption du renouvellement de l'ATP donne rapidement lieu à l'arrêt de la fonction contractile et altère la fonction des pompes ioniques ATPases (e.g.  $Na^+/K^+$ -ATPase et  $Ca^{2+}$ -ATPase), ce qui induit progressivement une perturbation de l'équilibre ionique et provoque l'accumulation cytosolique de sodium et de calcium dans les cardiomyocytes (280). L'ischémie prédispose donc à l'ouverture du PTP en causant une déplétion du contenu tissulaire en nucléotides adényliques et en entraînant une surcharge calcique (280). Cependant, le pH acide, l'incapacité des mitochondries non-énergisées à prendre le calcium s'accumulant dans le cytosol (la prise de  $Ca^{2+}$  nécessitant un potentiel de membrane mitochondrial) ainsi que la présence d'ADP pourraient expliquer l'absence d'ouverture du PTP au cours de l'ischémie (280).

Toutefois, la réoxygénation ayant lieu au cours de la reperfusion contribue de manière importante au déclenchement de l'ouverture du PTP. En effet, l'oxygène permet le rétablissement partiel ou total de la force proton-motrice. Ceci permet l'entrée dans la matrice mitochondriale du  $Ca^{2+}$  cytosolique accumulé durant l'ischémie, un facteur crucial pour l'ouverture du PTP (316). Par ailleurs, le rétablissement du flux d'électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire donne lieu à une augmentation importante de la production d' $O_2^-$  et de  $H_2O_2$  (8, 294).

Cette augmentation de la production de ROS est une conséquence de 3 événements ayant lieu lors de l'ischémie : 1) l'accumulation de dommages aux complexes I et III de la chaîne respiratoire, les rendant plus susceptibles aux fuites d'électrons, 2) l'accumulation d'ubisemiquinone, un intermédiaire instable des quinones de la chaîne respiratoire, pouvant réagir avec l'oxygène moléculaire et 3) la déplétion des réserves antioxydantes enzymatiques (SOD, catalase) et non-enzymatiques (glutathion réduit)(190, 270). De plus, l'effet inhibiteur du pH acide sur l'ouverture du PTP qui prévalait durant la période ischémique est rapidement levé par le retour du pH à des valeurs normales dans les premières minutes de la reperfusion, sensibilisant davantage les mitochondries à une transition de leur perméabilité (Figure 9)(104).

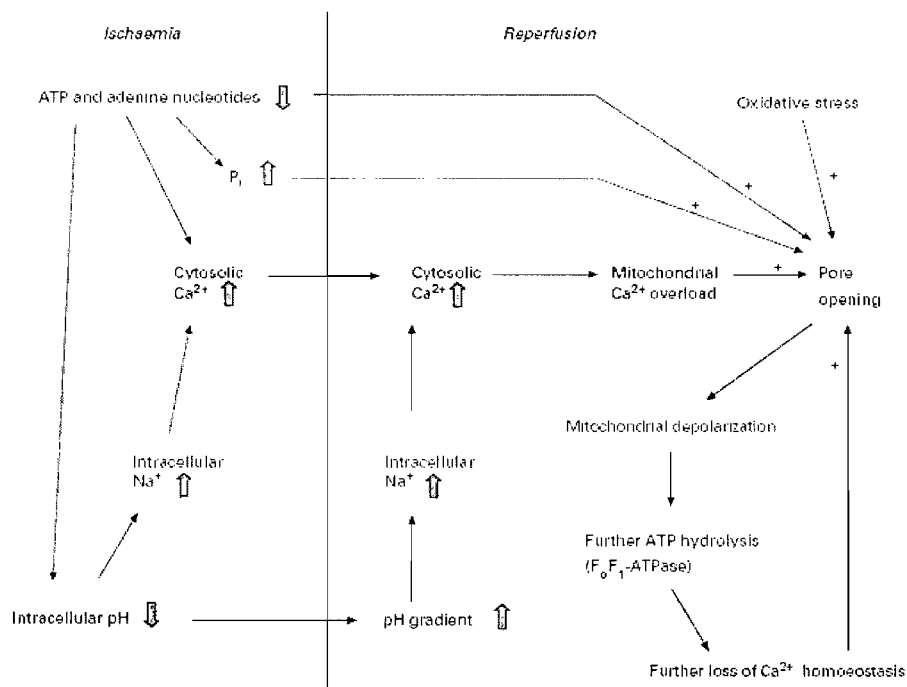


Figure 9. Ischémie-reperfusion et ouverture du PTP. Tiré de (61).

## **1.4. Exercice et cardioprotection**

### ***1.4.2. Introduction***

Il est maintenant bien accepté que la pratique régulière d'une activité physique diminue la mortalité et la morbidité liées aux maladies cardiaques ischémiques (200, 216, 253, 260, 265). La pratique régulière d'une activité physique est associée avec une réduction de 30 à 50% du risque de souffrir d'insuffisance coronarienne et, même si la pratique régulière de façon ininterrompue tout au long de la vie est associée aux niveaux de risque les plus faibles, une diminution importante des risques est aussi observée chez des individus qui commencent à être actifs après 40 ans (299). De plus, il a également été démontré que le taux de survie des patients victimes d'un infarctus du myocarde est supérieur si ceux-ci ont préalablement maintenu un rythme de vie actif (200), indiquant que l'exercice permet non seulement de prévenir la maladie coronarienne, mais également de protéger contre ses conséquences.

Ces effets bénéfiques sont reliés à l'impact de l'entraînement physique sur plusieurs facteurs de risque cardiovasculaires. L'exercice régulier contribue effectivement à prévenir le développement de l'hypertension et à diminuer la pression artérielle moyenne (260). Il permet également de diminuer le surpoids, la résistance à l'insuline, l'accumulation de lipides sanguins ainsi que les processus d'inflammation chronique (24, 260, 299). Compte tenu de la nature des travaux effectués dans cette thèse, ces aspects de la réponse à l'entraînement ne seront cependant pas traités en détails, mais plusieurs excellentes revues de littérature sont disponibles à ce sujet (93, 196, 260, 296, 311)

Par ailleurs, un bon nombre d'études menées à l'aide de modèles animaux au cours des quinze dernières années ont contribué à démontrer que l'exercice régulier engendre des adaptations cardiaques qui permettent d'atténuer les dysfonctions

contractiles et le dommage tissulaire induit par l'ischémie-reperfusion (3, 14, 16, 18, 34, 35, 41-44, 47, 52, 68, 69, 76, 84, 111-114, 123, 128, 143, 153, 169, 170, 175, 176, 182, 188, 189, 198, 217, 227, 232, 233, 248, 273, 278, 284, 285, 287, 307, 308, 313). Quelques études récentes démontrent également que l'exercice protège contre des stress oxydants induits par le traitement chronique avec des composés anti-tumoraux comme l'adriamycine et la doxorubicine qui sont bien connus pour leurs effets cardiotoxiques (14, 15, 144). Dans cette section, une revue des effets de l'entraînement sur la fonction mitochondriale ainsi que des mécanismes suggérés pour expliquer cet effet cardioprotecteur sera présentée. Lorsque pertinents, des liens entre ces mécanismes et une diminution possible de la vulnérabilité à l'ouverture du PTP seront établis.

#### ***1.4.3. Effets de l'entraînement sur les propriétés fonctionnelles et le dommage post-ischémique***

Plusieurs études effectuées à l'aide d'un modèle d'occlusion coronaire *in vivo* ont démontré que l'entraînement est associé à une meilleure résistance au dommage induit lors d'une IR (Tableaux 1 et 2) (3, 18, 68, 69, 76, 111-113, 123, 143, 188, 189, 227, 233, 308, 313). Cette résistance est mise en évidence par une diminution de la taille de l'infarctus ou une meilleure récupération de la fonction contractile en période de reperfusion (Figure 10). Une protection similaire a été observée sur des cœurs isolés perfusés *ex vivo* en modes Langendorff et travaillant (34, 35, 41-44, 47, 52, 84, 114, 128, 153, 169, 170, 175, 176, 182, 198, 217, 232, 248, 273, 278, 284, 285, 287, 307), indiquant que la cardioprotection peut aussi être mise en évidence lorsque le cœur est privé des effets systémiques de l'entraînement (Figure 11). Par ailleurs, il est important de noter que l'occurrence d'hypertrophie physiologique n'est pas obligatoire à l'apparition d'un phénotype cardioprotecteur. En effet, même si certains programmes d'entraînement induisant une protection sont associés à une hypertrophie (dix-sept études sur les quarante-huit disponibles)(14, 16, 34, 35, 41, 44, 47, 68, 114, 128, 143, 153, 227, 248, 273, 287, 313) (Tableau 1), la littérature portant sur

l'entraînement de courte durée suggère qu'un niveau de protection semblable en amplitude peut-être induit en absence complète d'hypertrophie (3, 18, 42, 43, 52, 69, 76, 84, 111-113, 123, 169, 170, 175, 176, 182, 188, 189, 198, 217, 232, 233, 278, 284, 285, 307, 308) (Tableau 2).

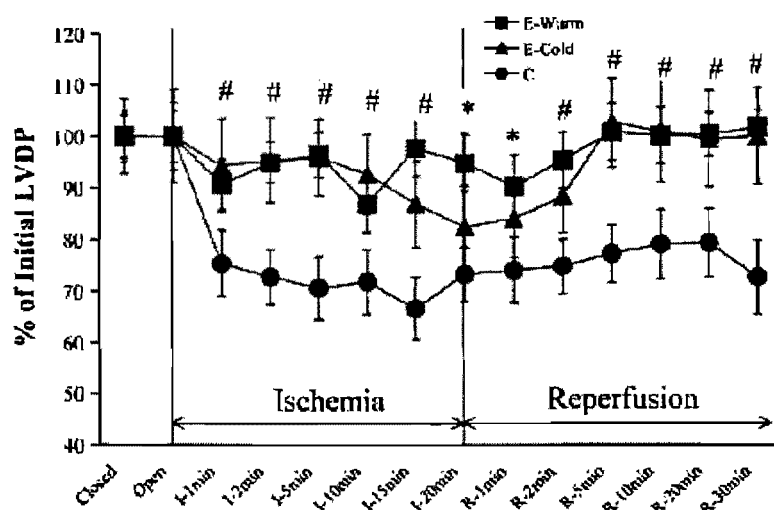


Figure 10. Meilleur maintien de la fonction contractile lors de l'IR avec l'exercice. La pression développée par le ventricule gauche (LVDP) est significativement plus grande lors de l'ischémie et de la reperfusion dans les groupes ayant fait un exercice dans un environnement chaud (E-Warm) ou froid (E-Cold) comparés au groupe contrôle (C). #  $p < 0.05$  pour E-warm et E-cold versus C. \*  $p < 0.05$  pour E-warm versus C. Tiré de (111).

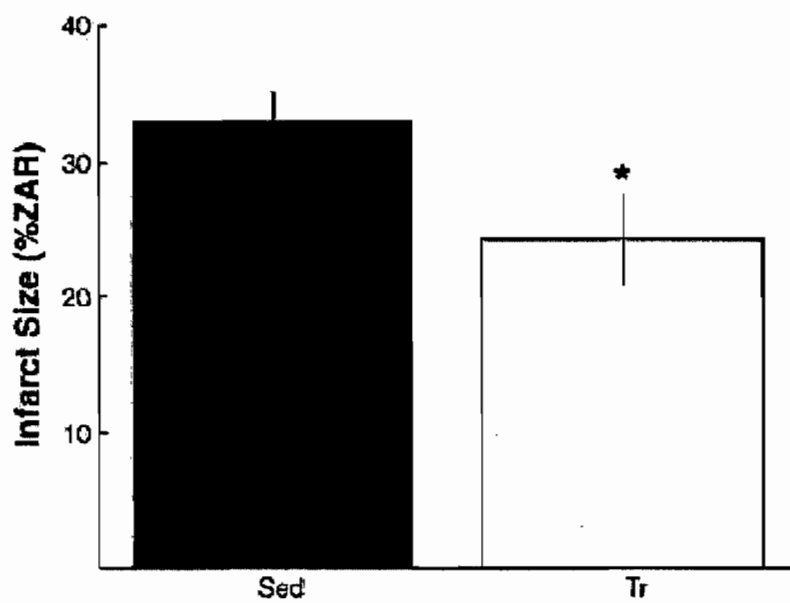


Figure 11. L'entraînement diminue la taille de l'infarctus suite à une IR. Taille de l'infarctus exprimée en pourcentage de la zone à risque ischémique. La taille de l'infarctus est significativement plus petite dans le groupe entraîné (Tr) comparé au groupe contrôle (Sed) ( $p < 0.05$ ). Tiré de (42).



Tableau I. Études rapportant un effet cardioprotecteur d'un exercice avec hypertrophie cardiaque

| Référence                 | Modèle           | Exercice               | I/R (durée)                 | Résultats et/ou mécanismes proposés   |
|---------------------------|------------------|------------------------|-----------------------------|---|
| Ji et al. (143)           | Rat SD<br>F      | Nage<br>5 SEM          | In vivo (OCG)<br>30/15      | ↑ glutathion, ↓ dégradation nucléotides adényliques / modif. utilisation des substrats            |
| Harris et Starnes (114)   | Rat SD<br>M      | Course<br>3,6 ou 9 SEM | In vitro (CT)<br>22.5/30    | ↑ HSP70 (*mesures des protéines et activités enzymatiques sans IR)                                |
| Scheuer et Stezoski (248) | Rat Wistar<br>M  | Nage<br>8 SEM          | In vitro (PL/CT)<br>5/5     | * hypoxie et non ischémie<br>N/S  |
| Zhang et al. (313)        | Rat SD<br>M      | Nage<br>8 SEM          | In vivo (OCG)<br>30/240     | ↑ expression et activation d'Akt via PI3K, ↓ apoptose (TUNEL+), ↓ activité caspase 3              |
| Spencer et al. (273)      | Rat Wistar<br>F  | Nage<br>8-10 SEM       | In vitro (PLr)<br>16*/32    | ↑ activité CK, ↑ réserve coronaire<br>* hypoxie ≠ ischémie  |
| Demirel et al. (68)       | Rat SD<br>F      | Course<br>10 SEM       | In vivo (OCG)<br>5/10       | ↓ peroxydation ↑ HSP72  |
| Powers et al. (227)       | Rat SD<br>F      | Course<br>10 SEM       | In vivo (OCG)<br>20/10      | ↓ peroxydation, ↓ oxydation thiols, ↑ HSP72, ↑ activité PFK, Mn/Cu-ZnSOD                          |
| Burelle et al. (44)       | Rat SD<br>F      | Course<br>10 SEM       | In vitro (CT)<br>20/40      | ↓ oxydation du glucose post-ischémie et ↑ oxydation du palmitate pré/post-ischémie                |
| Chaves et al. (47)        | Rat Wistar<br>M  | Course<br>10 SEM       | In vitro (PL)<br>30/60      | ↑ activité SOD et GPx   |
| Kihlstrom (153)           | Rat Wistar<br>M  | Nage<br>11 SEM         | In vivo (PL)<br>45 /20      | ↓ peroxydation (↓ TBARS), ↑ G6PDH / ↑ potentiel anaérobie, ↑ act. CK, ↑ GSH                       |
| Hwang et al. (128)        | Rat SD<br>M      | Course<br>10-12 SEM    | In vitro (PL)<br>15/30      | ↑ expression chaînes lourdes de myosine (MHC-β)   |
| Brown et al. (41)         | Rat SD<br>F      | Course<br>12 SEM       | In vitro (PL)<br>60/180     | ↑ expression canaux sarcoK <sub>ATP</sub>   |
| Bowles et al. (34)        | Rat F344<br>M    | Course<br>11-16 SEM    | In vitro (CT)<br>25/15      | N/S   |
| Bowles et al. (35)        | Rat F344<br>M    | Course<br>11-16 SEM    | In vitro (CT modifié) 25/15 | ↓ prise de Ca <sup>2+</sup> sarcolemmale en reperfusion<br>↓ perte nucléotides adényliques et PCr |
| Ascensao et al. (14)      | Rat Wistar<br>M  | Course<br>14 SEM       | In vitro (AR mito) 1/4      | ↑ HSP60 et 70 ↑ MnSOD, Cu/ZnSOD (contenu et activité) ↓ MDA                                       |
| Ascensao et al. (16)      | Rat Wistar<br>M  | Course<br>14 SEM       | In vitro (AR mito) 1/4      | ↓ peroxydation des lipides, ↑HSP60 et HSP70 / ↑ antioxydants                                      |
| Thorp et al. (287)        | Rat SD<br>M et F | Course<br>14 SEM       | In vitro (PL)<br>30/30      | M : cardioprotection ↑HSP70<br>F : ≠ cardioprotection, ↑HSP70, ↓eNOS                              |

M : mâles, F : femelles, SEM : semaines, OCG : occlusion coronaire gauche, PL : perfusion Langendorf, CT : cœur travaillant, AR : anoxie-réoxygénation, IR : ischémie-reperfusion, CK : créatine kinase, eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*, G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase, GSH : glutathion réduit, HSP : *heat shock protein*, MDA : malondialdéhyde, MHC-B : isoforme bêta de la chaîne lourde de myosine, Mn/Cu-ZnSOD : manganese/cuivre-zinc superoxyde dismutase, PCr : phosphocréatine, PFK : phosphofructokinase, TBARS : *thiobarbituric acid-reactive substances*, \*particularité de cette étude.

Tableau II. Études rapportant un effet cardioprotecteur d'un exercice sans hypertrophie cardiaque

| Référence              | Modèle                         | Exercice  | I/R                             | Résultats et/ou mécanismes proposés   |
|------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|---|
| Yamashita et al. (308) | Rat Wistar<br>M                | Course<br>1 J (30min)                           | In vivo (OCG)<br>20/48h         | ↑ activité MnSOD (via ↑ ROS qui activent TNF $\alpha$ et IL2 $\beta$ qui activent MnSOD)                                    |
| Yamashita et al. (307) | Rat SD<br>M                    | Course<br>1 J (30min)                           | In vitro (PL)<br>35/120         | ↑ activation PKC  |
| Paroo et al. (217)     | Rat SD<br>M/F/F <sub>ovx</sub> | Course<br>1J (60min)                            | In vitro (PL)<br>30/30          | M/F <sub>ovx</sub> : cardioprotection : ↑ HSP70<br>F/F <sub>ovx+oestrogènes</sub> : ≠ cardioprotection, ↓HSP70              |
| Domenech et al. (76)   | Chien<br>N/S                   | Course<br>1 J (5x 5min)                         | In vivo (OCG)<br>60/270         | ↑ expression canaux K <sub>ATP</sub> mitochondriaux   |
| Babai et al. (18)      | Chien<br>M et F                | Course<br>1J (21min)                            | In vivo (OCG)<br>25/25          | ↑ iNOS  |
| Starnes et al. (278)   | Rat F344<br>M<br>4/12/21m      | Course 1J<br>(60min :70-75%VO <sub>2max</sub> ) | In vitro (CT)<br>22.5/30        | 4m : ↑ HSP70 et catalase<br>12m : ↑ HSP70<br>21m : ↑HSP70, catalase et MnSOD  |
| Locke et al. (182)     | Rat SD<br>M                    | Course<br>1 ou 3 J                              | In vitro (PL)<br>30/30          | ↑ HSP72   |
| Taylor et al. (284)    | Rat SD<br>F                    | Course<br>1 ou 3 J                              | In vitro (CT)<br>17/30          | ↑ HSP72 (due à ↑ de température)  |
| Brown et al. (43)      | Rat SD<br>M et F               | Course<br>1 ou 5 J                              | In vitro (PL)<br>60/120         | ↑ sarcoK <sub>ATP</sub><br>(SED : + sarcoK <sub>ATP</sub> et MnSOD chez F vs M)   |
| Hoshida et al. (123)   | Rat Wistar<br>M                | Course<br>2 J (30min/J)                         | In vivo (OCG)<br>20/48h         | ↑ activité MnSOD  |
| Taylor et al. (285)    | Rat F344<br>M                  | Course<br>2 J (60min/J)                         | In vitro (CT)<br>22.5/30        | ↓ production ROS  |
| Hamilton et al. (111)  | Rat SD<br>F                    | Course<br>3 J                                   | In vivo (OCG)<br>20/30          | ↑ MnSOD / ↑ antioxydants  |
| Lennon et al. (169)    | Rat SD<br>M                    | Course<br>3 J                                   | In vitro (CT)<br>20.5/30        | ↑ HSP72 et catalase   |
| Lennon et al. (170)    | Rat SD<br>M                    | Course<br>3 J                                   | In vitro (PL/CT)<br>25/30       | ↑ catalase / ↑ antioxydants ou protéines impliquées dans la gestion du Ca <sup>2+</sup>                                     |
| Hamilton et al. (112)  | Rat SD<br>M                    | Course<br>3 J                                   | In vivo (OCG)<br>15/30          | ↓ des arythmies via une ↑ MnSOD   |
| Quindry et al. (232)   | Rat F344<br>M<br>6/24-26m      | Course<br>3 J                                   | In vitro (CT)<br>45/90          | ↓ activation calpaïnes et caspase-3,<br>24-26m : ↑MnSOD / ↑ antioxydants,<br>↓ activation de protéases par Ca <sup>2+</sup> |
| French et al. (84)     | Rat N/S<br>M                   | Course<br>3 J                                   | In vitro (CT)<br>25/45          | ↓ dégradation de SERCA2a et de PLB,<br>↓ production résidus carbonyles (↓ ROS)  |
| Quindry et al. (233)   | Rat SD<br>M                    | Course<br>3 J                                   | In vivo (OCG)<br>50/120         | ↓ apoptose (TUNEL positif)  |
| Demirel et al. (69)    | Rat SD<br>F                    | Course<br>3 ou 5 J                              | In vivo (OCG)<br>30/30          | ↑ HSP72, ↑ activité MnSOD,<br>↑ contenu GSH   |
| Hamilton et al. (113)  | Rat SD<br>F                    | Course<br>5 J                                   | In vivo (OCG)<br>20/30 – 60/120 | ↑ HSP72, ↑ MnSOD et SOD total<br>(si diète riche en antioxydant ≠ HSP72)  |
| Chicco et al. (52)     | Rat SD<br>M et F               | Course<br>5 J                                   | In vitro (PL)<br>60/120         | ↑ canaux sarcoK <sub>ATP</sub><br>(importance accrue chez F)  |

Tableau 2 (suite)

|                          |   |  |                         |  |
|--------------------------|---|--|-------------------------|--|
| Akita et al.<br>(3)      | Souris M<br>eNOS <sup>-/-</sup> et<br>C57BL/6 | Course<br>7 J                            | In vivo (OCG)<br>30/120 | ↑ activité iNOS  |
| McElroy et al.<br>(189)  | Rat SD<br>M                                   | Nage<br>5 SEM                            | In vivo (OCG)<br>48h    | ↑ vascularisation coronarienne   |
| Libonati et al.<br>(175) | Rat SD<br>M                                   | Course<br>6 SEM                          | In vitro (PL)<br>20/30  | ↑ SOD / ↑ activité G3PDH, ↑ sensibilité des myofilaments au Ca <sup>2+</sup>                           |
| Libonati et al.<br>(176) | Rat SD<br>M                                   | Course<br>6 SEM                          | In vitro (PL)<br>20/30  | Préservation de la fonction diastolique de LV, ↓ contracture   |
| Marini et al.<br>(188)   | Rat SD<br>M                                   | Course<br>14SEM<br>55%VO <sub>2max</sub> | In vivo (OCG)<br>30/90  | ↑ MnSOD et HSP70, ↑ expression de plusieurs gènes liés au potentiel antioxydant, mais pas à l'apoptose |
| Brown et al.<br>(42)     | Rat SD<br>F                                   | Course<br>20 SEM                         | In vitro (PL)<br>60/120 | ↑ réponse hyperémique, ↑ perfusion hors de la zone d'infarctus, ↑ MnSOD et CuSOD                       |
| Mòran et al.<br>(198)    | Rat Wistar<br>M                               | Course<br>24 SEM                         | In vitro (PL)<br>20/15  | ↑ HSP72  |

M : mâles, F : femelles, m : mois, SEM : semaines, OCG : occlusion coronaire gauche, PL : perfusion Langendorff, CT : cœur travaillant, IR : ischémie-reperfusion, GSH : glutathion réduit, G3PDH : glycéril-3-phosphate déshydrogénase, HSP : *heat shock protein*, IL2β : interleukine 2β, iNOS : *inducible nitric oxide synthase*, LV : *left ventricle*, MnSOD : manganese superoxyde dismutase, OVX : ovariectomisées, PKC : protéine kinase C, PLB : phospholamban, ROS : *reactive oxygen species*, sarcoKATP : canaux KATP sarcolemmaux, SERCA2a : isoforme 2a de la pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase du réticulum sarcoplasmique.

#### 1.4.4. Mécanismes proposés

Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer la meilleure récupération des cœurs de rats entraînés suite à une IR indépendamment du modèle d'exercice utilisé (court ou long terme; course ou nage). Les mécanismes les plus souvent cités dans la littérature sont une amélioration du potentiel antioxydant, une augmentation de l'expression des protéines chaperonnes (HSP; *heat shock proteins*), particulièrement de HSP72, et une augmentation de l'expression et/ou de l'activité des canaux potassiques sensibles à l'ATP sarcolemmaux (sarcoK<sub>ATP</sub>) et mitochondriaux (mitoK<sub>ATP</sub>). Une modification de la dynamique calcique intracellulaire, une amélioration de la fonction mitochondriale et, plus récemment,

une modification de l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques ont aussi été suggérées. Une synthèse des études rapportant un effet cardioprotecteur de l'exercice ou de l'entraînement lors de l'IR ainsi que les mécanismes proposés par les auteurs est présentée dans les Tableaux 1 et 2. Les études sont classées en ordre croissant de la durée du protocole d'entraînement.

#### *1.4.4.1. Stress oxydant*

Un entraînement permettant une exposition régulière à une production accrue de ROS permettrait une modulation et, plus précisément, une amélioration des systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques tant chez l'Animal (13) que chez l'Homme (79). D'autre part, une supplémentation alimentaire en antioxydants (113), la surexpression de l'isoforme mitochondrial de SOD (MnSOD) (49) ou l'utilisation d'antioxydants ciblant la mitochondrie (MitoQ) (2) contribuent tous à diminuer les dommages induits par l'IR. Il a ainsi été proposé que l'effet cardioprotecteur de l'exercice régulier soit lié à une diminution du stress oxydant, ce qui réduirait les dommages cellulaires induits par les ROS lors de l'IR et permettrait donc une meilleure récupération. Suite à un épisode d'IR, plusieurs études montrent une diminution des niveaux de malondialdéhyde (MDA) et des groupements protéiques carbonylés indiquant une diminution de la peroxydation des lipides et de l'oxydation des protéines par les ROS, respectivement, au niveau du cœur de Rat entraîné en comparaison au Rat sédentaire (14, 16, 68, 84, 111, 113, 227). De plus, bien qu'une certaine variabilité existe dans la littérature en ce qui concerne le type d'antioxydants pouvant être modulés par l'exercice (13), l'adaptation la plus fréquemment citée afin d'expliquer l'effet cardioprotecteur de l'exercice suite à l'IR est l'augmentation de l'activité et/ou de l'expression de SOD et, plus particulièrement, de MnSOD au niveau du cœur entraîné (14, 16, 42, 47, 69, 111-113, 123, 175, 188, 227, 232, 278, 308). L'augmentation de l'activité de MnSOD est favorisée par un exercice de haute intensité ou de longue durée (226) et semble un

élément important du phénomène cardioprotecteur puisque son inhibition lors de l'entraînement par une technique de *gene silencing* amène la perte de l'effet bénéfique de l'exercice sur l'arythmie de reperfusion (112). Ces résultats sont remis en question par d'autres auteurs qui observent un effet cardioprotecteur de l'entraînement sans augmentation de l'activité de MnSOD (170, 285). Ces études utilisent cependant un protocole d'IR court induisant une hibernation (*stunning*) et non un dommage important, suggérant des adaptations différentes selon l'ampleur du dommage induit (229). Enfin, d'autres études suggèrent aussi qu'une augmentation de catalase (CAT) (169, 170, 278), de glutathion peroxydase et de glutathion réductase (234), du contenu en glutathion réduit (GSH) (69, 143, 153) ou une diminution de la production de ROS (145, 285) puissent être impliquées dans l'effet cardioprotecteur de l'exercice contre l'IR. D'autre part, la fonction de la chaîne respiratoire, considérée comme la source la plus importante de production de ROS durant la reperfusion (291, 294), est mieux maintenue suite à un épisode d'anoxie-réoxygénation *in vitro* dans des mitochondries isolées à partir de cœurs de rats entraînés et ce phénomène est accompagné de niveaux de MDA significativement plus bas lorsque comparé à des mitochondries isolées à partir de rats cœurs sédentaires (14, 16).

Une diminution de la production de ROS pourrait favoriser la conformation fermée du PTP. En effet, il a été montré qu'une augmentation du stress oxydant favorise la conformation ouverte du PTP en entraînant l'oxydation des groupements thiols de l'ANT (104). De plus, l'oxydation des cardiolipins de la membrane interne mitochondriale par les ROS facilite la relâche de cytochrome c et le dommage aux complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire (224). Une diminution du stress oxydant lors de l'IR entraînerait donc moins de dommages aux éléments de la chaîne respiratoire ce qui favoriserait la récupération du potentiel de membrane mitochondrial lors de la reperfusion ainsi que le maintien d'une meilleure fonction respiratoire et de niveaux adéquats de nucléotides adényliques, facilitant aussi le maintien du PTP dans sa conformation fermée (14, 16, 316). De plus, la

conformation fermée du PTP est aussi favorisé par le maintien d'un ratio glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) élevé (316).

#### ***1.4.4.2. Protéines chaperonnes (HSP)***

L'entraînement physique de courte (182, 278) ou de longue durée (16, 198, 244) augmente de 4 à 12 fois l'expression de HSP72 (111, 114, 182, 227, 284) et de HSP60 (mitochondriale)(14-16), deux protéines dont l'expression est fortement accrue en réponse à un stress (par opposition à une forme constitutive comme HSP73) et plusieurs études suggèrent que la cardioprotection associée à l'exercice pourrait être attribuable à HSP72 (14, 16, 68, 69, 113, 114, 170, 182, 188, 198, 217, 227, 278, 287).

En plus de leur rôle de chaperon permettant de faciliter la synthèse de nouvelles protéines suite à un dommage ischémique, l'augmentation de l'expression des protéines de la famille de HSP70 (dont HSP72 fait partie) est associée à la translocalisation de nouvelles protéines permettant la réparation d'organelles, du cytosquelette ou de pompes ioniques, ainsi qu'à la suppression de NADPH oxydase, la réduction de la production de ROS et la protection des mitochondries contre les ROS et les cytokines telles que TNF $\alpha$  et ce, probablement en stimulant l'activité de la CAT et de la MnSOD (26, 282). HSP70 contribue aussi à inhiber la réponse apoptotique en inhibant l'activation de JNK, en liant directement AIF et Apaf1 ce qui l'empêche de former l'apoptosome ou en bloquant l'activation de caspase-3 (88). De plus, après un choc hyperthermique entraînant une augmentation de HSP70, la morphologie mitochondriale est mieux préservée (66, 225) et la fonction mitochondriale est mieux maintenue après l'IR avec une accumulation moindre de calcium ainsi qu'un RCR, une consommation d'oxygène en stade 3 et 4 et un potentiel de membrane mieux maintenus comparativement aux mitochondries contrôles (33, 134, 225, 310). Certains auteurs proposent toutefois que

l'augmentation de température corporelle et non de la charge de travail imposée au cœur à l'exercice soit responsable de l'augmentation de HSP72 (274, 284). Un entraînement au froid de 9 semaines n'entraînant pas d'augmentation de HSP72 n'a pas d'effet cardioprotecteur (114) bien qu'un entraînement aigu au froid améliore la récupération post-ischémique sans élévation de HSP72 (111, 233, 284).

Il est aussi proposé que l'action cardioprotectrice des HSP soit plutôt induite par l'augmentation concomitante d'enzymes antioxydantes (catalase, SOD) (15, 282) ou par une diminution de la production de ROS (119). Il a de plus été observé au niveau du foie chez le Rat qu'un choc hyperthermique puisse contribuer à inhiber l'ouverture du PTP dans des mitochondries isolées subséquentement et ce, possiblement grâce à une augmentation de l'expression de la protéine mitochondriale HSP25. Ainsi, les HSP pourraient donc contribuer à limiter le dommage mitochondrial induit durant l'IR en permettant de maintenir la morphologie et la fonction mitochondriale et ainsi, un potentiel membranaire et une production d'ATP adéquats pour la récupération des fonctions cellulaires. De plus, une accumulation moindre de calcium et une préservation de l'ATP ainsi que le maintien d'un potentiel de membrane favorisent la conformation fermée du PTP. Par ailleurs, tel que montré par He et Lemasters (119), un rôle régulateur des HSP au niveau de l'ouverture du PTP n'est pas exclu.

#### ***1.4.4.3. Canaux K-ATP***

Plusieurs études provenant du laboratoire de Moore (41, 43, 52) ont montré une augmentation de l'expression des sous-unités Kir6.2 et SUR2A du canal  $K_{ATP}$  après un entraînement de courte et de longue durée chez le Rat, suggérant une augmentation de l'expression de l'isoforme sarcolemmal des canaux  $K_{ATP}$ . Cette augmentation est corrélée avec une diminution de la taille de l'infarctus après l'IR (41, 43, 52). De plus, l'inhibition pharmacologique de l'ouverture des canaux

sarcoK<sub>ATP</sub> par HMR-1098 abolit complètement l'effet cardioprotecteur mis en évidence par une diminution de la taille de l'infarctus suite à l'IR, tant d'un entraînement de courte durée (1 et 5 jours) (52) que de longue durée (20 semaines) (41) suggérant un rôle de ce canal dans le phénomène de cardioprotection.

Domenech et al. (76), en utilisant un protocole aigu d'exercice chez le Chien (5 fois 5 minutes de course sur tapis roulant immédiatement ou 24h avant l'IR) ont toutefois suggéré un rôle de l'isoforme mitochondrial du canal K<sub>ATP</sub> puisque l'utilisation de l'inhibiteur 5-hydroxydécanoate (5-HD) abolissait l'effet de préconditionnement apporté par l'exercice aigu. Cet effet n'est toutefois pas observé par Brown et al. (41) en utilisant le même inhibiteur. Dans la littérature, il est suggéré que l'ouverture des canaux mitoK<sub>ATP</sub>, provoque un influx d'ions K<sup>+</sup> dans la matrice mitochondriale, entraînant la dépolarisation membranaire suivie d'un gonflement et d'une alcalinisation de l'espace matriciel ce qui, en période d'ischémie, pourrait contrebalancer le phénomène de contraction de la matrice observé lors de l'ischémie et ainsi contribuer à diminuer l'hydrolyse d'ATP, maintenir l'intégrité de l'espace intermembranaire mitochondrial et accélérer la récupération de concentrations optimales d'ATP lors de la reperfusion (60, 72).

Une augmentation de MgADP augmente la probabilité d'ouverture du canal entraînant, au niveau sarcolemmal, une augmentation de l'efflux d'ions K<sup>+</sup> lors de la repolarisation membranaire ce qui pourrait soit raccourcir la durée du potentiel d'action et diminuer l'entrée de calcium par les canaux calciques de type L pour ainsi diminuer la surcharge calcique (97), soit réduire l'excitabilité membranaire en l'hyperpolarisant et préserver ainsi les réserves intracellulaires d'ATP (52, 142). Ainsi, l'ouverture des canaux K<sub>ATP</sub> pourrait contribuer à favoriser la conformation fermée du PTP. D'ailleurs, il a été montré que l'ouverture pharmacologique des canaux mitoK<sub>ATP</sub> par le diazoxide diminue l'ouverture du PTP (59, 72). La diminution du potentiel de membrane provoquée par l'ouverture des canaux



mitoK<sub>ATP</sub> pourrait diminuer la force proton motrice nécessaire à l'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale ou pourrait causer une alcalinisation de la matrice entraînant une légère augmentation de la production de ROS suffisante pour affecter l'état redox des groupements thiols critiques, inhibant ainsi l'ouverture du PTP (72).

#### 1.4.4.4. *Dynamique calcique*

Selon Bowles et Starnes (35), l'entraînement pourrait contribuer à prévenir la surcharge calcique en diminuant l'entrée de calcium extracellulaire durant la reperfusion tel que mis en évidence par une diminution de l'entrée de l'isotope  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  dans des cœurs entraînés comparés à des cœurs sédentaires. Cette diminution pourrait être due à une modulation des flux calciques trans-sarcolemmaux qui sont contrôlés par les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (35, 197). Dans des mitochondries isolées de cœur de Rat (219) et de Chien (271) entraînés, l'accumulation de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  est aussi diminuée en comparaison avec des mitochondries de cœurs sédentaires. De plus, Moràn et al. (199) ont observé une augmentation de la densité des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) et à la ryanodine (RYR) ainsi que de l'activité de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA-2) dans l'homogénat de ventricule de cœur entraîné suite un entraînement de course de 24 semaines chez le Rat. Par ailleurs, une détérioration de la fonction de SERCA-2 due une augmentation de 2 à 7 fois de l'activité des protéases calpaïnes lors de l'IR a été montrée dans des cœurs perfusés (263). Une amélioration du système de gestion du calcium par l'entraînement, soit par une diminution de l'entrée de calcium dans le cytosol et/ou par une augmentation de la reprise de calcium dans le réticulum sarcoplasmique pourrait donc théoriquement diminuer l'entrée de calcium dans la mitochondrie et ainsi prévenir une surcharge calcique et une activation prononcée des calpaïnes qui entraîneraient une perte de fonction. Par ailleurs, le calcium étant le principal agent favorisant l'ouverture du PTP, tout mécanisme permettant de diminuer la surcharge calcique durant la reperfusion pourrait contribuer à diminuer la probabilité d'ouverture du PTP (316).

#### 1.4.4.5. *Fonction mitochondriale*

Penpargkul et al. (219) ont montré une légère diminution de la consommation d'oxygène en stade 3 (respiration maximale supportée par l'ajout d'ADP), mais aucun changement du ratio ADP:O de mitochondries isolées de cœurs de rats entraînés à la course pendant 8 semaines et ce, que ce soit en présence de substrats respiratoires alimentant le complexe I (glutamate-malate) ou le complexe II (succinate). Ascensao et al. (15, 16) ont aussi obtenu des ratios ADP:O et RCR (*respiratory control ratio*) similaires dans des mitochondries isolées de cœurs de rats entraînés et sédentaires. Toutefois, ces auteurs ont mis en évidence de légères modifications des paramètres respiratoires avec l'entraînement en montrant une augmentation de la consommation d'oxygène par milligramme de protéines mitochondriales en stade 3 et en stade 4, ainsi que par une plus grande inhibition de la respiration en stade 4 par l'addition de GDP, un inhibiteur spécifique des protéines découplantes UCP, suggérant une diminution du potentiel de membrane par un mécanisme impliquant les UCP (16). De telles modifications ne sont toutefois pas observées systématiquement : d'autres études ne montrent aucune modification (35, 277) ou une diminution (166) de la consommation d'oxygène en stades 3 et 4 avec l'entraînement sans toutefois affecter les ratios ADP:O et RCR. Ainsi l'entraînement ne semble pas affecter de façon importante la fonction basale mitochondriale en conditions normales.

Néanmoins, deux études ont étudié l'effet d'une anoxie-reperfusion (AR) *in vitro* sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de rats sédentaires ou entraînés 14 semaines à la course sur tapis roulant (14, 16). Suite à l'anoxie *in vitro*, tous les paramètres respiratoires mesurés en présence de glutamate-malate (respiration en stade 3 et 4 et les ratios RCR et ADP:O) sont altérés dans les mitochondries isolées à partir des cœurs sédentaires. La respiration en stade 3 est diminuée, suggérant une dysfonction de la chaîne respiratoire suite à un dommage de ses enzymes oxydoréductases et/ou une diminution de l'apport en équivalents réduits (16). De

plus, la respiration en stade 4 est augmentée, suggérant une augmentation de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons (16). Par ailleurs, ces paramètres sont mieux préservés après l'AR dans les mitochondries isolées à partir de cœurs entraînés, avec une diminution moindre de la respiration en stade 3 et pas d'augmentation de la respiration en stade 4, entraînant ainsi une diminution moindre du ratio RCR comparé au groupe sédentaire (Figure 12)(16). De plus, aucun changement n'est observé pour le ratio ADP:O dans le groupe entraîné après l'AR suggérant un maintien de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (14, 16). D'ailleurs, on note une meilleure préservation des nucléotides adényliques suite à l'IR dans les cœurs entraînés laissant suggérer un meilleur maintien de la production d'ATP ce qui favoriserait le maintien du PTP dans sa conformation fermée (35, 143).

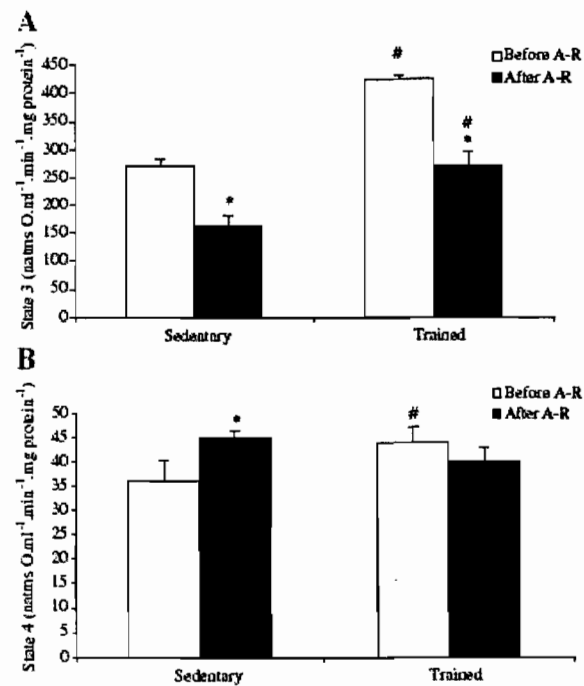


Figure 12. L'entraînement prévient la diminution de la respiration mitochondriale après l'IR.

Mitochondries isolées de cœurs de rats sédentaires et entraînés à la course sur tapis roulant pendant 14 semaines respirant avec des substrats du complexe I (glutamate-malate). Respiration en stade 3 (A) et en stade 4 (B). \* $p < 0.05$  comparé à avant l'anoxie-réoxygénation (A-R). #  $p < 0.05$  comparé au groupe sédentaire. Tiré de (16).

#### 1.4.4.6. *Effecteurs de mort cellulaire*

Quelques études proposent que l'effet cardioprotecteur de l'exercice puisse être lié à une diminution de l'activation des voies apoptotiques. Une diminution significative de l'apoptose, telle que mise en évidence par une diminution de l'indice apoptotique (résultat positif au test TUNEL; *terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labelling*), a été montrée après l'IR suite à un entraînement de courte durée sur tapis roulant (3 à 5 jours) (232, 233) et de longue durée (8 semaines) à la nage (313) chez le Rat. De plus, dans ces études, l'activité de la caspase-3 est significativement plus basse dans les cœurs entraînés lorsque comparés aux cœurs sédentaires suite à l'IR (232, 233, 313). À l'état non-stressé (avant l'IR), peu de changement sont observés avec l'entraînement en ce qui concerne l'expression de Bax, AIF, Apaf-1 ou de l'activité de caspase-3, bien que certains auteurs aient observé une augmentation de l'expression de Bcl-2 (267) ou et de Bax et Bcl-2, mais sans changement au niveau du ratio Bcl-2/Bax (164).

Zhang et al. (313) ont observé une augmentation de l'expression d'Akt avec l'entraînement et, suite à l'IR, une augmentation de 2.5 fois de la phosphorylation de celle-ci comparée à une augmentation de 1.6 fois dans le groupe sédentaire. La kinase sérine-thréonine Akt, une cible de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), est une médiatrice importante de la survie cellulaire et son activation a été associée à une meilleure survie suite à l'IR *in vivo* et *in vitro* (86). L'activation accrue d'Akt dans le groupe entraîné est accompagnée d'une augmentation de l'activation de GSK-3 $\beta$ , une cible d'Akt, et cette réponse est bloquée par un prétraitement à la wortmannin, un inhibiteur de PI3K, ce qui entraîne une augmentation de l'indice apoptotique et de la taille de l'infarctus et donc, la perte de l'effet cardioprotecteur de l'entraînement (313). L'augmentation de l'expression d'Akt avec l'entraînement pourrait être dû à une augmentation des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire, dont l'augmentation a été montrée à l'exercice aigu et prolongé (133).

D'autre part, Quindry et al. (232, 233) proposent plutôt que l'augmentation de l'expression de certains antioxydants, tel que MnSOD, puisse contribuer à diminuer l'activation des voies pro-apoptotiques. Tel que mentionné précédemment, une augmentation de MnSOD, bien qu'elle pourrait ne pas être liée avec l'effet cardioprotecteur de l'exercice lors d'un *stunning* (112, 170), a toutefois été corrélée avec une diminution de la taille de l'infarctus suite à une IR plus longue (308). De plus, selon Temsah et al. (286), une augmentation des défenses antioxydantes pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie du calcium intracellulaire durant l'IR puisqu'une perfusion de SOD et de catalase avant et pendant l'IR améliore la relâche et la recapture de calcium par le réticulum sarcoplasmique et augmente l'expression de l'ARNm de SERCA-2, RyR, phospholamban (PLB) et calséquestrine. Récemment, French et al. (84) ont montré qu'un entraînement à la course de 3 jours sur tapis roulant chez le Rat n'entraîne pas de changement au niveau du contenu protéique en calpaine ou en calpastatine, la protéine inhibitrice endogène des calpaines, mais abolit plutôt leur activation au même niveau que lorsque l'inhibiteur CI3 (*calpain inhibitor 3*) est ajouté au medium de perfusion avant l'IR. De plus, l'inhibition de l'activation des calpaines dans le groupe entraîné est associée à une prévention de la dégradation de SERCA-2 et de PLB lors de l'IR (84). Les calpaines peuvent activer directement caspase-3 et sont des effecteurs de la mort cellulaire nécrotique. Une diminution de l'activation des calpaines pourrait donc être cardioprotectrice en contribuant à diminuer l'activation des voies de mort cellulaire. Les mécanismes précis pour expliquer ce phénomène n'ont pas été élucidés, mais les auteurs suggèrent qu'une augmentation de l'expression de certains antioxydants pourrait prévenir l'activation des calpaines et/ou la dégradation de protéines impliquées dans la gestion du calcium intracellulaire telles que SERCA-2 et PLB et ainsi empêcher la création d'un cercle vicieux dans lequel l'accumulation de calcium intracellulaire suite à un dommage initial entraînerait une activation accrue de protéases et ainsi, un dommage plus prononcé (84). Par ailleurs, les mêmes phénomènes favoriseraient aussi le maintien du PTP dans sa conformation fermée.

De plus, l'ouverture du PTP étant un élément déclencheur important de ces voies de mort cellulaire, il est possible qu'une modulation de la probabilité d'ouverture du PTP puisse contribuer à l'effet cardioprotecteur de l'exercice.

#### ***1.4.5. Résumé***

Plusieurs hypothèses ont été proposées dans la littérature pour tenter d'expliquer l'effet cardioprotecteur de l'exercice. Récemment, Ciminelli et al. (54) ont montré que suite à un entraînement aigu de 5 jours, l'ouverture du PTP est diminuée dans un cœur perfusé soumis à une IR. Toutefois, il n'existe pas de données sur l'effet d'un entraînement régulier sur la régulation du pore de perméabilité transitionnelle mitochondrial dans le cœur. Or, à la lumière des résultats présentés dans cette section de revue de littérature, plusieurs points (e.g. diminution du stress oxydant, meilleur maintien de la fonction mitochondriale grâce aux HSP ou à l'action des canaux  $K_{ATP}$ , diminution de la surcharge calcique) laissent présager que l'entraînement pourrait moduler le PTP et que celui-ci pourrait jouer un rôle dans le phénomène de la cardioprotection.

La première étude faisant l'objet de cette thèse avait donc comme objectif de déterminer si un entraînement de 10 semaines de course sur tapis roulant chez le Rat pouvait moduler la régulation du pore de perméabilité transitionnelle. Notre hypothèse était que l'entraînement diminuerait la probabilité d'ouverture du PTP lors d'un stress calcique.

## 1.5. Hypertrophie pathologique

### 1.5.2. Introduction

Le remodelage ventriculaire hypertrophique est une réponse typique du cœur à plusieurs formes de stress. Ce processus peut être déclenché en réponse à un stress aigu comme la perte de tissu contractile à la suite d'un infarctus ou à des stress chroniques, comme l'hypertension artérielle et la déficience valvulaire (83). Au niveau des cardiomyocytes, l'hypertrophie cardiaque pathologique est accompagnée d'une variété de changements, incluant des modifications de la gestion du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, de la fonction des sarcomères, du métabolisme énergétique ainsi que de plusieurs voies de signalisation (27, 85, 149, 309). Des changements au niveau de la matrice extracellulaire comme le remodelage du collagène et la prolifération du tissu fibreux accompagnent également les changements observés au niveau des cardiomyocytes (27, 83).

Contrairement aux adaptations observées en réponse à l'hypertrophie physiologique induite par l'exercice, la plupart, sinon la totalité, de ces changements semblent être néfastes pour le cœur. En effet, plusieurs études épidémiologiques ont associé l'hypertrophie du ventricule gauche à une augmentation significative de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire ainsi qu'à une augmentation des risques de défaillance cardiaque (25, 27, 172). Cependant, malgré l'association bien établie entre l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque, les raisons pour lesquelles certains cœurs progressent vers l'insuffisance alors que d'autres parviennent à maintenir un état compensé sont encore très mal connues.

Parmi les nombreux facteurs potentiellement impliqués dans la pathogénèse de l'insuffisance cardiaque, l'apparition de dysfonctions mitochondriales a fait l'objet de plusieurs études (186, 187, 191, 215, 238, 240, 256). Ceci tient principalement au



fait que le développement de dysfonctions pourrait contribuer d'une part au déséquilibre énergétique chronique observé dans le cœur insuffisant (6, 275) et d'autre part à l'augmentation du niveau de stress oxydant (131, 132, 290). Suite au constat que les mitochondries jouent un rôle crucial et universel dans la signalisation de la mort cellulaire, plusieurs études récentes ont également investigué la voie mitochondriale de mort cellulaire et fourni des évidences de son implication dans l'insuffisance cardiaque (1, 235, 236, 241, 293). L'ensemble des évidences expérimentales recensées à ce sujet seront discutées dans la section qui suit.

### ***1.5.3. Dysfonctions mitochondriales dans le cœur insuffisant***

Les mitochondries de cœurs défaillants sont plus nombreuses, mais plus petites que celles du tissu sain et elles sont caractérisées par un gonflement de leur espace matriciel, la distorsion et la diminution du nombre de leurs cristae et une plus grande incidence de rupture de leurs membranes internes et externes (Figure 13) (17, 215, 240). De plus, l'altération de la structure mitochondriale est corrélée avec d'autres indices de sévérité de la défaillance cardiaque tels qu'une augmentation des niveaux plasmatiques de noradrénaline, une augmentation de la pression télé-diastolique du ventricule gauche et une diminution de la fraction d'éjection (240).

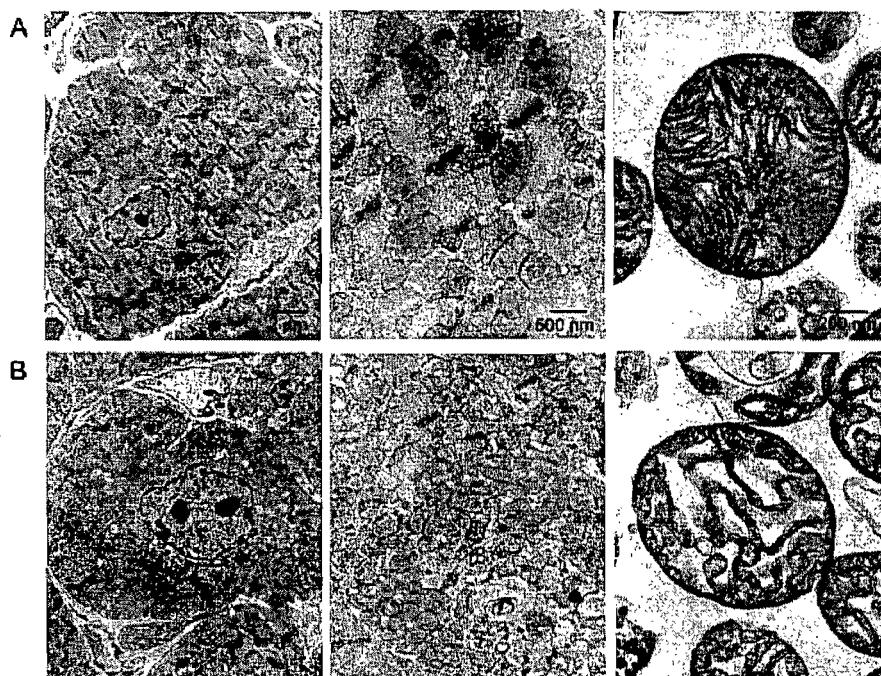


Figure 13. Ultrastructure cellulaire et mitochondriale dans un cœur défaillant.

Images de microscopie électronique de tissus de cœurs de souris contrôles WT (A) et transgéniques  $\text{TNF}\alpha$ -TG (B) (panneaux de gauche et du centre) et de mitochondries isolées (panneaux de droite). Tiré de (215).

L'activité de plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire et de l'appareil de phosphorylation oxydative est altérée dans le cœur défaillant. Plusieurs études ont montré une diminution de l'activité des complexes I (131, 132, 247), II (137), III (131, 137, 187, 194), IV (131, 231) et V (187, 194, 212) dans le cœur défaillant en comparaison au cœur contrôle. De plus, la capacité respiratoire mesurée au niveau de mitochondries isolées (138, 215, 247, 250, 258) ou de fibres perméabilisées (256) est aussi altérée dans différents modèles de défaillance cardiaque (Figure 14). Chez le

Chien, une défaillance cardiaque induite par la création de plusieurs embolies coronaires entraîne une diminution de la capacité respiratoire des mitochondries énergisées avec du glutamate et du malate en stades 2, 3 et 4 ainsi que du ratio RCR dans toutes les régions du cœur étudiées, soient les parois subendocardiale et subépicardiale du ventricule gauche, le septum ventriculaire et la paroi du ventricule droit (256). Des résultats similaires sont observés chez l'Homme, dans des cœurs dont la défaillance est due tant à une cardiomyopathie ischémique qu'à une cardiomyopathie dilatée idiopathique (258). Chez le Rat, la consommation d'oxygène et le ratio RCR de mitochondries isolées 12 ou 18 semaines après l'installation d'une ligature de l'artère coronaire sont réduits en présence de divers substrats respiratoires alimentant les complexes I, II et IV et ce, en présence ou non d'ADP (138). D'autre part, dans un modèle de défaillance cardiaque induite par la surexpression cardio-spécifique du  $\text{TNF}\alpha$ , la production d'ATP est significativement diminuée suggérant une altération de la phosphorylation oxydative (215). De plus, chez l'Homme le ratio PCr/ATP, diminué dans le cœur insuffisant, semble être un indicateur de l'altération du métabolisme ainsi qu'un facteur prédictif de la mortalité des patients atteints de cardiomyopathie dilatée (208). Ce phénomène pourrait être lié à une altération des systèmes de transfert d'énergie, notamment de la créatine kinase mitochondriale dont l'expression protéique et l'activité totale sont diminuées lors de l'insuffisance cardiaque (295, 312). De plus, la créatine kinase mitochondriale, qui est considérée comme un élément putatif du pore de perméabilité transitionnelle (voir section 1.2.4), peut moduler la probabilité d'ouverture du PTP en présence de créatine et une diminution de son activité pourrait favoriser la conformation ouverte, permettant ainsi le déclenchement des voies nécrotique et apoptotique intrinsèque de mort cellulaire (75).

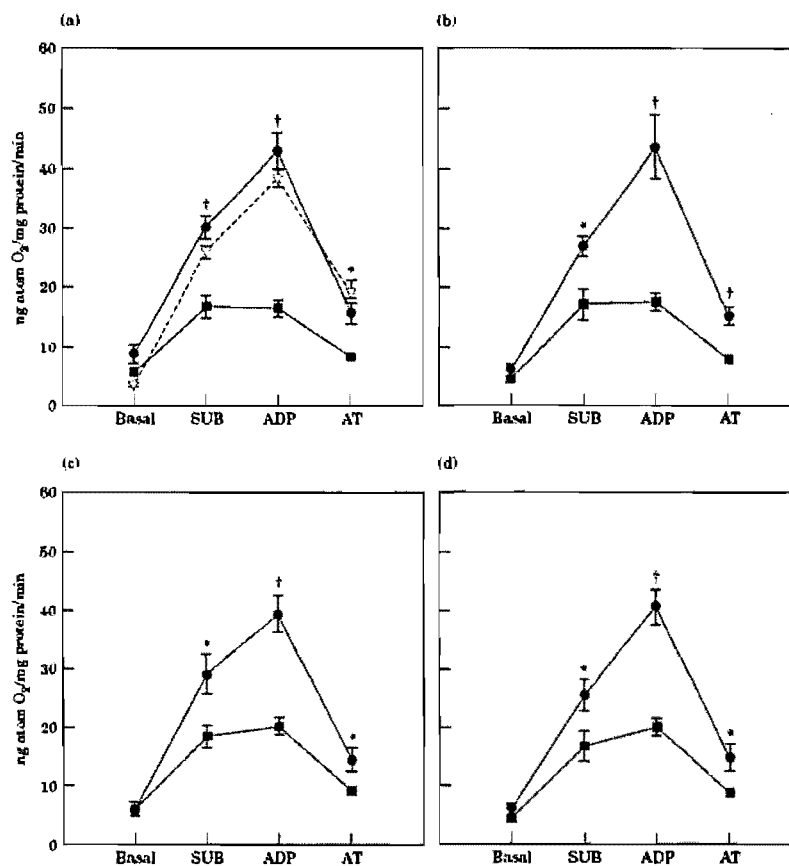


Figure 14. Consommation d'oxygène de mitochondries isolées de cœurs défailants.

Consommation d'oxygène en  $\text{mg O}_2 \cdot \text{mg protéine}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  de mitochondries isolées de cœurs de chiens normaux (●) ou défailants (■). La respiration basale et la respiration mesurée après l'ajout des substrats respiratoire glutamate-malate (SUB), d'ADP (ADP) et d'actractoyside (AT) sont représentées dans différentes régions du myocarde : (a) paroi subendocardiale du ventricule gauche, (b) paroi subépicardiale du ventricule gauche, (c) septum interventriculaire et (d) paroi du ventricule droit. En (a) et (b), la ligne pointillée représente la respiration mesurée chez des souris Swiss Webster contrôles. \*  $p < 0.05$ , †  $p < 0.001$ . Tiré de (256).

Par ailleurs, la diminution de la fonction mitochondriale au niveau du cœur défaillant est associée à une augmentation du stress oxydant attribuée à une augmentation de la production de ROS au niveau des complexes I et III de la chaîne de transport des électrons ou à une diminution des réserves antioxydantes (71, 130-132, 156, 262, 268). L'augmentation de la production de ROS mitochondriale est associée à une diminution significative de l'activité des complexes I et III au niveau du cœur défaillant (131, 132). Une réduction significative de l'activité des enzymes SOD et glutathion peroxydase (GPx) ainsi qu'une augmentation du contenu en glutathion oxydé (GSSG) ont été observées chez le Rat et Cochon d'Inde défaillant (71, 268). De plus, chez la Souris, l'inactivation cardio-spécifique du gène de la MnSOD entraîne le développement d'une défaillance cardiaque liée à l'augmentation du stress oxydant. On observe chez ces souris une déformation de la structure des cristaux mitochondriaux ainsi qu'une diminution de l'activité des complexes I, II, III et V de la chaîne de transport des électrons (211).

En accord avec cette hypothèse, une supplémentation en agents antioxydants améliore la fonction cardiaque chez le Hamster cardiomyopathique BIO 14.6 et dans un modèle de défaillance cardiaque induite par l'administration d'adriamycine chez le Rat (156, 268). De plus, l'administration de bisoprolol, un  $\beta$ -bloqueur prévenant la diminution d'expression et d'activité de MnSOD sans affecter l'activité de l'enzyme NADPH oxydase, atténue le développement de la dysfonction cardiaque chez le Hamster cardiomyopathique BIO TO-2 (129). Finalement, la surexpression de MnSOD chez la Souris diabétique OVE26 améliore la fonction contractile du cardiomyocyte et la fonction mitochondriale en atténuant la diminution de respiration en stade 3 et du ratio RCR (259).

Une des conséquences possibles du stress oxydant mitochondrial dans le cœur insuffisant est l'apparition de mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) entraînant une diminution des transcrits d'ARN mitochondrial et de la synthèse protéique (130).

En effet, en plus d'être situé à proximité des éléments producteurs de ROS de la chaîne de transport des électrons, l'ADNmt ne possède pas de protéines protectrices comme l'histone de l'ADN nucléaire et se réplique rapidement sans mécanismes de réparation efficaces (301). De plus, l'expression de l'ADN mitochondrial, qui code pour 13 protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative est contrôlée par le nombre de copies, ce qui implique qu'une diminution importante du nombre de copies d'ADNmt entraîne inévitablement une diminution de la transcription de l'ARN mitochondrial et de la synthèse des protéines de la chaîne respiratoire entraînant ainsi une dysfonction mitochondriale. L'impact de la présence de ROS sur l'ADNmt a été mis en évidence *in vitro* dans des cellules isolées d'endothélium vasculaire par une diminution significative du nombre de copies d'ADNmt en présence de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  et  $ONOO^{\cdot-}$  (22). De plus, dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par la ligature de l'artère coronaire chez la Souris dans lequel une augmentation de la production de ROS a déjà été montrée (131, 132), on observe une diminution de 44% du nombre de copies d'ADN mitochondrial ainsi qu'une diminution de 30 à 50% de tous les transcrits d'ARN mitochondrial en comparaison au groupe contrôle (130). Par ailleurs, dans ce modèle, aucun changement n'est observé au niveau de l'ARN messager de la chaîne lourde de myosine ou de la MnSOD, deux protéines dont l'expression est contrôlée par l'ADN nucléaire. De plus, chez ces souris insuffisantes, l'activité enzymatique des complexes I, III et IV, dont l'expression de plusieurs sous-unités est sous le contrôle de l'ADN mitochondrial, est significativement diminuée (130). Les activités du complexe II et de la citrate synthase, dont l'expression est contrôlée par l'ADN nucléaire, demeurent toutefois inchangées (130).

Prises dans leur ensemble, les données disponibles démontrent donc la présence de multiples dysfonctions mitochondriales dans le cœur insuffisant pouvant

potentiellement diminuer la production d'énergie et nuire à l'équilibre redox cellulaire.

#### ***1.5.4. Dysfonctions mitochondriales dans le cœur compensé***

Néanmoins, durant la phase d'hypertrophie compensée, on observe une prolifération de petites mitochondries dont l'ultrastructure semble normale (115, 283). On trouve donc un plus grand nombre de plus petites mitochondries, dont la surface d'échange moyenne est augmentée (283). Les études ayant observé la fonction mitochondriale lors du stade d'hypertrophie compensée sans dysfonction systolique montrent que celle-ci est normale ou légèrement augmentée (Figure 15)(39, 57, 67, 165, 180, 272, 279, 283). La fonction respiratoire basale n'est pas modifiée alors que la respiration en stade 3 est identique ou augmentée lors de l'hypertrophie compensatoire et la phosphorylation oxydative demeure couplée (57, 67, 138, 279). Par ailleurs, le nombre de mitochondries est augmenté à ce stade de la pathologie, probablement en réponse à une diminution du ratio ATP:ADP entraîné par l'augmentation de la demande énergétique (303).

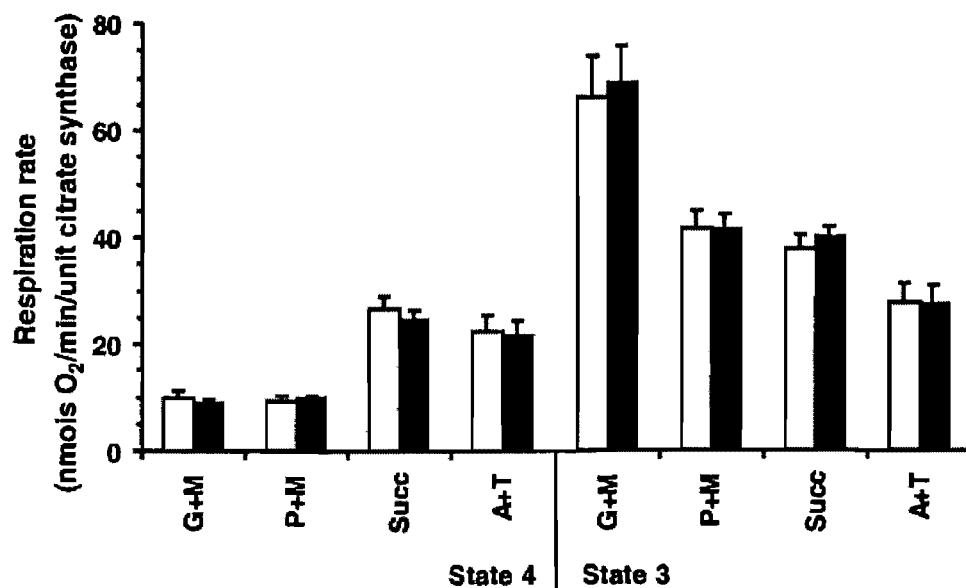


Figure 15. Fonction respiratoire de base de mitochondries de cœurs hypertrophiés.

Fonction respiratoire de mitochondries isolées de cœurs de rats sham (blanc) et hypertrophiés (8 semaines de constriction de l'aorte) (noir) en stade 3 et 4 en réponse à divers substrats respiratoires. G+M : glutamate plus malate, P+M : pyruvate plus malate, Succ : succinate, A+T : ascorbate plus *N,N,N,N'*-tetraméthyl-*p*-phenylendiamine (TMPD). Tiré de (39).



Cependant, certaines études rapportent des modifications plus subtiles notamment au niveau de la régulation du complexe IV de la chaîne respiratoire. En effet, à l'aide d'un modèle de constriction de l'aorte abdominale, Brookes et al. (39) ont rapporté que les mitochondries de cœurs hypertrophiés sont plus susceptibles à l'inhibition du complexe IV par le NO, qui exerce son effet en compétitionnant avec l'oxygène pour un site de liaison entre l'hème et le  $\text{Cu}^{2+}$  au centre du complexe IV. Ce remodelage hypertrophique est également associé à une augmentation de l'expression de l'enzyme iNOS qui semble progressive. En effet, en comparaison avec des cœurs normaux, l'expression d'iNOS est augmentée par un facteur de 1.7 et 3 à 8 et 22 semaines post-chirurgie, respectivement (39). Brookes et al. (39) suggèrent que malgré l'absence de dysfonction respiratoire évidente à l'état basal *in vitro*, une inhibition du complexe IV par le NO pourrait contribuer à affecter le fonctionnement de la chaîne respiratoire dans le cœur compensé *in vivo*. Cependant, tel que mentionné par ces auteurs, une inhibition de l'activité du complexe IV de l'ordre de 65% est nécessaire pour observer une diminution significative de la respiration (39). Il est donc improbable que l'augmentation de la biodisponibilité et de la sensibilité au NO entraîne réellement une diminution de la respiration et de la synthèse d'ATP. Cependant, il est possible que ce phénomène puisse contribuer à augmenter la production de radicaux libres par les complexes de la chaîne respiratoire. En effet des études sur des astrocytes corticaux isolés montrent qu'une inhibition partielle de la chaîne de transport des électrons à un niveau insuffisant pour entraîner une diminution du potentiel de membrane, de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP provoque toutefois une augmentation de la production de ROS qui persiste après que l'on ait levé l'inhibition (135). Cependant, peu d'études ont directement mesuré la production de radicaux libres par la chaîne respiratoire à ce stade de la pathologie.

Par ailleurs, certaines études rapportent une augmentation de la capacité antioxydante dans le cœur compensé. En effet, une augmentation de l'activité de

SOD et de GPx est observée 12 semaines après l'induction d'une constriction de l'aorte abdominale chez le Rat (100) et 10 semaines après la création d'une constriction de l'aorte ascendante chez le Cochon d'Inde (70, 71). De plus, dans ces études, les niveaux de peroxydation lipidiques sont plus bas et le ratio GSH/GSSG est plus élevé (70, 71, 100). Cette réponse bénéfique en apparence suggère néanmoins la présence d'un certain stress oxydant qui ne peut-être contenu qu'au prix d'une augmentation des mécanismes de défense. Il est donc possible de concevoir que l'incapacité à maintenir des défenses antioxydantes adéquates face à une montée de la production de radicaux libres puisse jouer un rôle dans l'apparition des dysfonctions de l'oxydation phosphorylante et dans la transition vers la décompensation cardiaque.

#### *1.5.5. Rôle des mitochondries dans la signalisation de la mort cellulaire dans le cœur insuffisant*

Plusieurs évidences expérimentales obtenues chez l'Homme et l'Animal démontrent clairement la présence de multiples formes de mort cellulaire dans le cœur insuffisant (74, 121, 147, 163, 206, 213). La présence accrue de cellules affichant des marqueurs typiques d'apoptose comme la condensation de la chromatine et la présence de fragmentation de l'ADN génomique sont rapportées dans plusieurs études (148, 194, 195, 206, 213). Des signes de nécrose, possiblement causée par des ischémies focales ou des processus d'inflammation chronique sont également observés dans certains cas (121, 158). Finalement, des études récentes démontrent également la présence d'autophagie dans le cœur insuffisant (121, 155, 158). Cependant, le rôle de cette forme de mort cellulaire dans le développement de l'insuffisance demeure incertain et reste à être caractérisé. Globalement, la perte de cardiomyocytes associée à ces processus introduit probablement un cercle vicieux dans lequel les cardiomyocytes restants sont soumis à des niveaux croissants de stress. L'activation des mécanismes de mort cellulaire est donc perçue comme un facteur important contribuant à la décompensation cardiaque (1, 235, 236, 241, 293).

Bien que plusieurs mécanismes mènent à l'activation de la mort cellulaire, un bon nombre d'évidences expérimentales obtenues dans le cœur insuffisant suggèrent que les mitochondries jouent un rôle important. En effet, une augmentation de la relâche de cytochrome c (246, 254), d'AIF et de HtrA2/Omi (266) ainsi que de l'activité de caspase-9 (246, 254) et caspase-3 (195, 206, 254) est observée au niveau du cœur insuffisant.

Tel que mentionné précédemment (section 1.2.3.3), deux grands mécanismes de perméabilisation mitochondriales sont théoriquement impliqués dans ce phénomène, le premier étant le recrutement et l'oligomérisation dans la membrane externe des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax, Bak, Bid, etc...) et le second étant l'ouverture du PTP. Dans le cœur insuffisant des études menées chez l'Homme (213) et l'Animal (195, 254) rapportent une augmentation de l'expression du facteur pro-apoptotique Bax et une diminution de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Ces observations ont mené à la suggestion que la formation de pores dans la membrane externe est accrue en état d'insuffisance. Cependant, cette hypothèse demeure à être confirmée puisque Bax et Bcl-2 agissent également comme régulateurs du PTP (36, 160, 201, 205, 218).

Par ailleurs, quelques études récentes démontrent clairement que l'occurrence de l'ouverture du PTP est augmentée dans le cœur insuffisant (138, 215, 257). Les premières évidences proviennent d'études effectuées dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par la surexpression cardio-spécifique du TNF $\alpha$ . Dans ce modèle, les mitochondries sont plus vulnérables aux dysfonctions respiratoires induites par une anoxie-réoxygénation *in vitro* que les mitochondries contrôles, entraînant une inhibition accrue de la phosphorylation oxydative (215). La respiration et la production d'ATP sont aussi inhibées de manière plus importante suite à une

surcharge calcique dans les mitochondries de cœurs défailants (215). De plus, leur capacité de rétention calcique est moindre et la relâche de cytochrome c suite à l'AR et au stress calcique est augmentée, suggérant une plus grande susceptibilité d'ouverture du PTP (Figure 16) (215). Ces résultats ont par la suite été corroborés dans des modèles physiologiques d'insuffisance cardiaque. En effet, Javadov et al. (138) ont rapporté que l'ouverture du PTP est accrue dans le cœur de Rat insuffisant isolé après 12-18 semaines de remodelage post-infarctus. Fait notable, cette ouverture accrue est détectable en condition de perfusion normoxique (Figure 17), suggérant qu'à ce stade de la pathologie, l'ouverture du PTP soit un processus bien enclenché qui ne nécessite pas de stress inducteur supplémentaire (e.g. l'ischémie-reperfusion *ex vivo*) pour être observable. Ce phénomène est également accompagné de signes indiquant une dysfonction mitochondriale notoire *in vitro* tels qu'une diminution de la capacité respiratoire en présence de divers substrats respiratoires ainsi qu'une susceptibilité accrue à l'inhibition respiratoire par le  $Ca^{2+}$  en présence de pyruvate-malate. D'autre part, Sharov et al. (255, 257) ont montré une diminution du potentiel de membrane, de la synthèse d'ATP, de la respiration COX-dépendante et de la respiration en stade 3 en présence de malate et de pyruvate dans des cardiomyocytes isolés perméabilisés provenant de cœurs défailants de chiens. Sans toutefois prévenir complètement ces dysfonctions, l'ajout de la CsA au milieu d'incubation a permis de les atténuer (255, 257), montrant ainsi un lien clair avec l'ouverture du PTP. Par ailleurs, en utilisant une technique de visualisation directe de l'ouverture du PTP sur des cardiomyocytes intacts, ces auteurs ont montré une occurrence accrue d'ouverture spontanée du PTP dans les cardiomyocytes provenant de cœurs insuffisants (257).

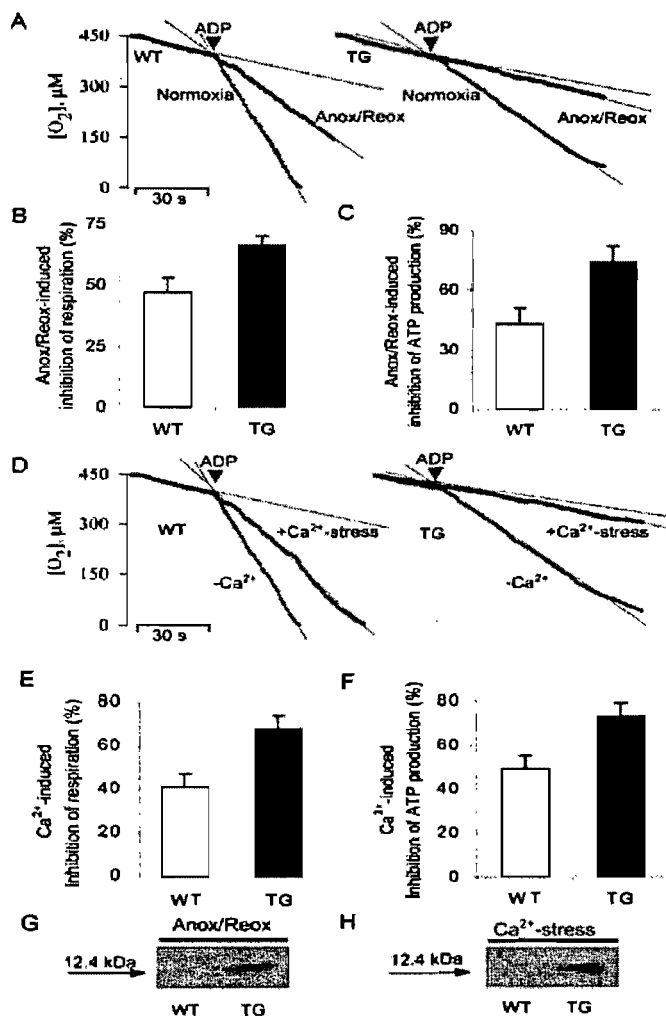


Figure 16. La vulnérabilité mitochondriale aux stress oxydant et calcique est augmentée dans le cœur défaillant.

Les mitochondries isolées de cœurs de souris normales (WT) et transgéniques surexprimant TNF $\alpha$  (TG) ont été soumises à une anoxie-réoxygénation (Anox/Reox) (A-C,G) ou à un test de rétention calcique (D-F,H). A,D : Tracés de respirométrie indiquant une inhibition plus sévère de la respiration en stade 3 chez les mitochondries TG suite à l'Anox/Reox ou au stress calcique. B,E : inhibition de la respiration en stade 3. C,F : inhibition de la production d'ATP. G,H : immunobuvardage de la fraction mitochondriale suite au stress oxydant (G) ou calcique (H) indiquant une augmentation de la relâche de cytochrome c chez les TG.

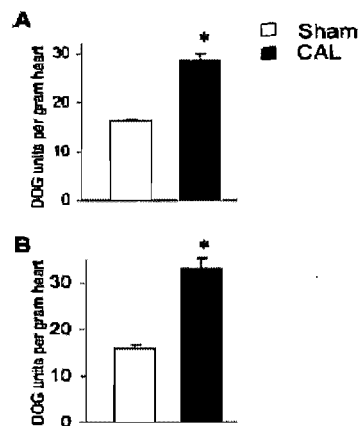


Figure 17. L'ouverture du PTP est augmentée suite à une ligature de l'artère coronaire chez le Rat.

Ouverture du PTP représentée par le nombre d'unités de DOG dans les mitochondries isolées de cœurs de rats contrôles (Sham) ou hypertrophiés 12 (A) ou 18 (B) semaines après une ligature de l'artère coronaire (CAL). Les valeurs représentées sont les moyennes  $\pm$  SEM. \* $p < 0.01$ . Adapté de (138).

Il est important de noter que dans ces trois études, l'activation de la transition de perméabilité a été observée à une période de la pathologie où de nombreuses dysfonctions mitochondriales importantes sont déjà présentes. En effet, les mitochondries de la Souris  $TNF\alpha$  présentent des altérations de la structure des cristae et de la matrice, une augmentation significative de la fréquence du dommage à l'ADN mitochondrial, une diminution de l'activité de la créatine kinase, une diminution marquée de la capacité de rétention calcique et une susceptibilité accrue aux stress calcique et oxydant accompagnée d'une augmentation de la relâche mitochondriale de cytochrome c (215). De même, les résultats de Javadov et al. (138) et Sharov et al. (255, 257) mettent en évidence que la diminution importante du

$\Delta\psi_m$  et la diminution de l'activité respiratoire et de la synthèse d'ATP au niveau des mitochondries de cœurs insuffisants peut être partiellement évitée par l'ajout de cyclosporine A (Figure 18). Ces données sont également compatibles avec l'ensemble des études qui ont évalué la fonction mitochondriale dans le cœur insuffisant (voir section 1.5.3). Prises dans leur ensemble, ces études ne permettent donc pas de déterminer si l'activation de la voie mitochondriale de la mort cellulaire est une conséquence tardive de l'insuffisance cardiaque causée par l'accumulation de dysfonctions mitochondriales ou un phénomène causal dans la pathogenèse qui peut survenir plus tôt lorsque les mitochondries n'affichent pas encore des déficits importants.

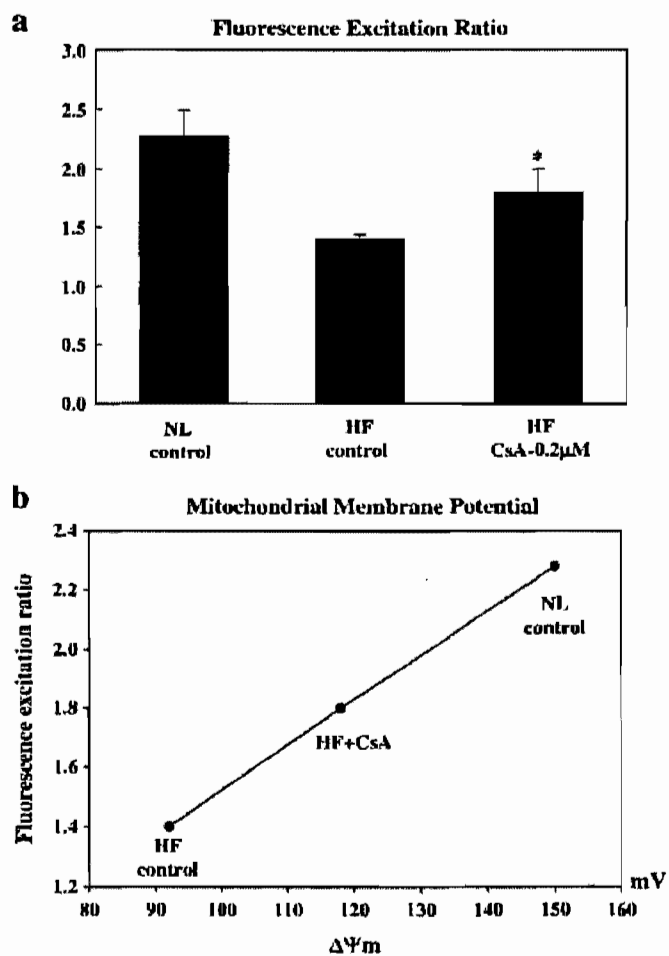


Figure 18. Effet de CsA sur le potentiel de membrane de cardiomyocytes normaux (NL) et défailants (HF).

A : Ratios de l'intensité des signaux de fluorescence rouge/verte émise par la sonde JC-1. B : Relation entre le ratio de fluorescence et le potentiel de membrane mitochondrial. Le  $\Delta\Psi_m$  a été calculé de manière empirique en prenant la valeur de 150 mV pour les cardiomyocytes normaux, ce qui équivaut à une  $\Delta\Psi_m$  pour les cardiomyocytes HF : 92 mV, et HF+CsA : 118mV. Tiré de (257).



### ***1.5.6. Rôle des mitochondries dans la signalisation de la mort cellulaire dans le cœur compensé***

Bien que plusieurs études aient clairement mis en évidence une activation des voies mitochondriales de la mort cellulaire dans le cœur insuffisant, notre compréhension actuelle des mécanismes menant à cette activation est limitée. Ceci tient en partie au fait que peu d'études se sont consacrées à l'étude de ces voies au cours de la phase compensée d'hypertrophie. Le groupe de Izumo (148), a étudié cette question en utilisant le Rat Dahl-SS (salt-sensitive), un modèle d'hypertension spontanée menant à l'hypertrophie cardiaque, puis à la décompensation après 6 et 12 semaines de diète enrichie en sel, respectivement. Avec ce modèle, à l'état d'hypertrophie compensée, Kang et al. (148) rapportent une augmentation du ratio Bax/Bcl-x<sub>L</sub> (due à une augmentation de l'expression de l'ARNm de Bax), de l'expression de l'ARNm des caspases-1, -2 et -3 et du récepteur de mort Fas ainsi que de l'expression protéique de la caspase-9. Toutefois, à ce stade de la pathologie, les auteurs n'observent pas d'augmentation de l'occurrence de fragmentation de l'ADN nucléaire mesurée par marquage TUNEL sur des homogénats de tissu ventriculaire. Cependant, cet indice apoptotique s'avère 15 fois plus élevé que dans les cœurs normaux lorsque le stade d'insuffisance est atteint (148).

Un phénomène notable rapporté dans l'étude de Kang et al. (148) est qu'à l'état compensé de la pathologie, les cardiomyocytes isolés sont plus vulnérables à différentes formes de stress induisant la mort cellulaire, incluant le stress oxydant, l'ajout de staurosporine et l'anoxie-réoxygénation. En effet, l'indice TUNEL (indicateur de l'apoptose) et le marquage nucléaire à l'iodure de propidium (indicateur de la nécrose) rapportés sont supérieurs dans les cardiomyocytes hypertrophiés comparativement aux cardiomyocytes contrôles en réponse à ces traitements (Figure 19). Puisque cette sensibilité accrue au stress des cardiomyocytes isolés précède l'apparition d'indices d'apoptose avancée (i.e. fragmentation de l'ADN) dans le tissu cardiaque, les auteurs ont suggéré qu'une augmentation de la

susceptibilité au stress pourrait contribuer à la progression de l'hypertrophie compensée vers l'insuffisance cardiaque (148).

Kang et al. (148) ne sont pas les premiers à constater la vulnérabilité du cœur hypertrophié au stress. En effet, des expériences effectuées sur des cœurs isolés perfusés *ex vivo* démontrent que l'hypertrophie est associée à une contracture précoce durant la phase d'ischémie et à une récupération fonctionnelle inférieure à celle des cœurs contrôles durant la phase de reperfusion (7, 9). Cependant, l'effet de l'hypertrophie sur la signalisation de la mort cellulaire n'a pas été documenté dans ces études.

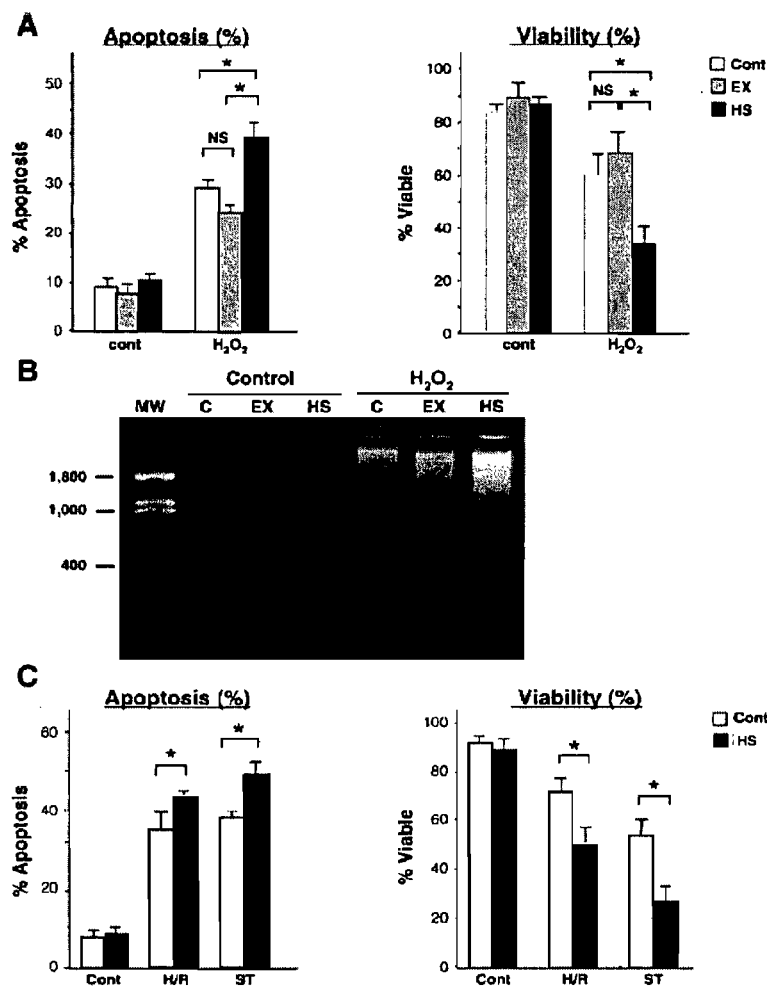


Figure 19. Augmentation de la susceptibilité aux stimuli apoptotiques avec l'hypertrophie pathologique.

Susceptibilité de cardiomyocytes contrôles (Cont) ou démontrant une hypertrophie physiologique (Ex) ou pathologique (HS) à divers stimuli apoptotiques. A : Apoptose et % de viabilité suite à une exposition de 24h à une dose de 0.1 mM de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). B : Fragmentation de l'ADN suite à l'exposition à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. MW : marqueur de poids moléculaire. C : Apoptose et % de viabilité des cardiomyocytes contrôles et HS suite à un épisode d'hypoxie-réoxygénation (H/R) et une exposition de 24h à 2μM de staurosporine (ST). \**p*<0.05 NS : non significatif. Tiré de (148).

Par ailleurs, dans une étude plus récente, Sharma et al. (254) ont utilisé un modèle de constriction de l'aorte ascendante chez le Cochon d'Inde pour étudier la signalisation de la mort cellulaire. Tout comme Kang et al. (148), ces auteurs rapportent des indices suggérant une activation des mécanismes initiaux d'induction de la mort cellulaire à l'état compensé de la pathologie tels qu'une augmentation du rapport Bax/Bcl-2, une diminution du potentiel de membrane mitochondrial mesuré sur des cardiomyocytes isolés, et une augmentation de la relâche de cytochrome c. Ces trois éléments sont des mécanismes qui se situent en amont dans la chaîne d'événements menant à la fragmentation de l'ADN et à l'apparition d'autres signes typiques d'apoptose. Par-contre, aucune information n'est disponible au sujet du mécanisme de perméabilisation mitochondriale impliqué et sur les facteurs qui l'induisent.

Tel que mentionné précédemment, la majorité des études disponibles suggèrent que la fonction mitochondriale mesurée est essentiellement préservée au cours de la phase compensée d'hypertrophie (voir section 1.5.4). Cependant, la majorité de ces études ont évalué le comportement des mitochondries dans des conditions optimales en absence de stress. Or, dans le cœur hypertrophié, les cardiomyocytes et leurs mitochondries sont susceptibles d'être soumis à des périodes prolongées de stress dues, par exemple, à des périodes d'ischémies transitoires, à une augmentation du stress oxydant et à un dérèglement de l'homéostasie calcique menant à une surcharge calcique en diastole (27). Une hypothèse plausible pourrait être que les mitochondries développent une vulnérabilité anormale à l'ouverture du PTP en réponse à certains de ces stress, et ce, même en l'absence de dysfonction majeure en absence de stress. Ce phénomène pourrait contribuer à augmenter la susceptibilité des myocytes aux dommages induits lors de stress aigus durant la phase compensée et à l'activation franche de la mort cellulaire observée dans le cœur insuffisant. Cette hypothèse est compatible avec les trois observations suivantes. Premièrement, les cardiomyocytes hypertrophiés sont plus sensibles à la mort

cellulaire induite par l'anoxie-réoxygénation et le stress oxydant, dans lesquels l'ouverture du PTP joue un rôle important (107, 148). Deuxièmement, les mitochondries isolées à partir de cœurs hypertrophiés sont plus sensibles aux dysfonctions respiratoires induites par l'exposition au stress oxydant *in vitro* (165). Troisièmement, le potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi$ ) mesuré *in situ* dans les cardiomyocytes hypertrophiés est inférieur à celui des mesures obtenues dans les cardiomyocytes normaux (254). Bien que plusieurs facteurs affectent  $\Delta\Psi$ , cette diminution pourrait refléter une occurrence accrue d'ouverture spontanée du PTP dans les cardiomyocytes hypertrophiés. Cependant, la vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP en situation de stress n'a jamais été directement investiguée dans le cœur hypertrophié. Les deux dernières études de cette thèse se sont penchées sur cette question.

## **2. Résultats**

### **2.1. Article 1**

#### **Titre**

Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria

#### **Auteurs**

Mariannick Marcil, Karine Bourduas, Alexis Ascah et Yan Burelle

#### **Journal**

Publié le 1er avril 2006 dans *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* (Am J Physiol Heart Circul Physiol. 2006 Apr; 290(4):H1549-H1557)

Reproduit avec la permission de The American Physiological Society

**EXERCISE TRAINING INDUCES A RESPIRATORY SUBSTRATE SPECIFIC INCREASE IN  
CA<sup>2+</sup>-INDUCED PERMEABILITY TRANSITION PORE OPENING IN HEART  
MITOCHONDRIA.**

Mariannick Marcil, Karine Bourduas, Alexis Ascah, Yan Burelle

Département de kinésiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-  
Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Running head: training and mitochondrial permeability transition pore

Contact information:

Yan Burelle, Ph.D

Université de Montréal


Dept. of kinesiology

P.O. Box 6128 Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Phone : 514-343-6083

Fax : 514-343-2181

E-mail : 

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to determine if regular exercise (treadmill running, 10 weeks) alters the susceptibility of rat isolated heart mitochondria to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening and whether this could be associated with changes in the modulation of PTP opening by selected physiological effectors. Basal leak-driven and ADP-stimulated respiration in the presence of substrates for complex I, II and IV were not affected by training. Fluorimetric studies revealed that in the control (C) and exercise-trained (T) groups, the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to trigger PTP opening was greater in the presence of complex II vs I substrates ( $230 \pm 12$  vs  $134 \pm 7$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg/protein,  $P < 0.01$ ; pooled average of control and trained groups). In addition, with a substrate feeding the complex II, training increased by 45 % ( $P < 0.01$ ) the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to trigger PTP opening both in the presence and absence of the PTP inhibitor cyclosporin A. However, membrane potential, reactive oxygen species production, NAD(P)H ratio, and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake kinetics were not different in mitochondria from both groups. Together, these results suggest the existence of a substrate-specific regulation of the PTP in heart mitochondria and suggest that regular exercise results in a reduced sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening in presence of complex II substrates.

**Key words:** Exercise, heart, mitochondrial function, calcium stress



## INTRODUCTION

Mitochondria play a pivotal role in controlling cell death through their capacity to trigger both necrosis and apoptosis (16, 18, 25, 39). A number of studies have shown that an increased permeability of the mitochondrial membranes is a key event in these processes (37, 41, 59). Although several mechanisms of membrane permeation have been suggested, one of the best documented involves the opening of the permeability transition pore (PTP).

The PTP is a high-conductance nonspecific pore presumably formed by a supramolecular complex spanning the double-membrane system of the mitochondria mainly at contact sites. Although it is increasingly recognized the molecular composition of the PTP is probably variable (61), the prevailing hypothesis is that it includes the adenylate translocator (ANT), the porin pore (voltage-dependent anion channel, VDAC), and the matrix protein foldase cyclophilin D. Opening of the PTP induces the loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), uncoupling of oxidative phosphorylation, high-amplitude swelling of the matrix, and the release of several proapoptotic factors that are normally sequestered in mitochondria such as cytochrome *c*, apoptosis-inducing factor, Smac/Diablo, endonuclease G, and Omi/HtrA2 (5, 25).

In the heart, PTP opening was shown to occur during reperfusion after ischemia and to be involved in contractile dysfunction and tissue injury (19, 23, 24, 31, 32, 35). This phenomenon can be explained by the fact that many of the conditions required to open the PTP *in vitro* prevail in cardiac cells early during reperfusion. On the other hand, ischemic preconditioning was shown to decrease the sensitivity to PTP opening in isolated mitochondria (1) and intact cardiomyocytes (28) and perfused hearts (27, 31). However, whether exercise training, another physiological stress capable of inducing a cardioprotective phenotype (9, 14, 42, 51), can beneficially alter the regulatory properties of the PTP remains largely unknown.

$\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) in the matrix is the most important determinant of PTP gating, with high  $[\text{Ca}^{2+}]$  favouring the open conformation (60). In addition, a variety of factors modulate the sensitivity of the PTP to  $\text{Ca}^{2+}$ , including variations in the  $\Delta\Psi$ , redox state of pyridine nucleotides (PNs), reactive oxygen species (ROS) production, and matrix pH as well as  $\text{P}_i$  and adenylate content (see (60) for review). In skeletal muscle mitochondria, the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the PTP was also shown to depend on the type of respiratory substrate oxidized, with complex I donors acting as sensitizers compared with complex II donors (22).

In the present study we therefore determined whether exercise training is associated with changes in the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening in isolated heart mitochondria. We also determined whether the type of substrate used for energization influences  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening in this organ and whether exercise training elicits changes in selected physiological modulators of PTP gating.

## METHODS

### *Animal care*

All experiments were conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Université de Montréal Animal Care Committee. Female Sprague-Dawley Rats (Charles River, St-Constant, PQ, Canada) weighing approximately ~250 g were housed in pairs and kept in a temperature-, humidity-, and light-controlled (12:12 h light-dark cycle) environment. The animals had free access to standard rat chow and water.

### *Exercise protocol*

After a week of habituation, animals were divided into control (C) and exercise-trained (T) groups. T rats were run on a motor-driven rodent treadmill (Quinton Instruments, Seattle, WA) at 25 m/min and 16 % slope on 4 days/wk for 10 wk. Running time was set at 30 min during the first week, 60 min during the second week, and 90 min during the third week. Running time was then maintained at 90 min for the remaining 7 wk.

### *Materials*

All chemicals were purchased from Sigma (St-Louis, MO), with the exception of cyclosporin A (CsA; Tocris, Ellisville, MO), and Calcium Green-5N (Molecular Probes, Eugene, OR).

### *Mitochondrial isolation*

Heart mitochondria were prepared as described by Fontaine et al. (22) with slight modifications. Animals were anesthetized (pentobarbital sodium 50 mg/kg ip) 48h after the last training session. Hearts were rapidly excised and immersed into ice-cold isolation medium (*buffer A*; in mM: 300 sucrose, 10 Tris-HCl, 1 EGTA, pH 7.3) and weighed. Ventricular tissue was minced with scissors in 5 ml of *buffer A* supplemented with 0.2% fatty acid free BSA and homogenized using a Polytron tissue tearer (~3 s at a setting of 3). The homogenate was then incubated with the

protease nalgase (1.5 mg/g) for 5 min and further homogenized at the same settings. The homogenate volume was completed to 30 ml with *buffer A* + 0.2% BSA and centrifuged at 800 g for 10 min. The pellet was discarded, and the supernatant was decanted and centrifuged at 10 000 g for 10 min. The pellet obtained was resuspended in *buffer B* (in mM: 300 sucrose, 0.5 EGTA, 10 Tris-HCl, pH 7.3) and centrifuged at 10 000 g for 10 min. After this washing step was repeated twice, the final mitochondrial pellet was resuspended in 0.3 ml of *buffer B* to a protein concentration of ~20 mg/ml. All procedures were carried out at 4°C. Protein determinations were performed using the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL), with BSA as a standard.

#### *Mitochondrial respiration*

Mitochondrial oxygen consumption was measured polarographically at 22°C, using Clark-type electrodes (Oxygraph, Hansatech Instruments, Kings Lynn, UK). Experiments were started with the addition of 0.30 mg of mitochondria in 1ml of *buffer C* (in mM: 125 KCl, 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05 EGTA, 10 Tris-MOPS, 2.5 MgCl<sub>2</sub>). Respiratory substrates feeding complex I (5mM glutamate-2.5 mM malate), complex II (5 mM succinate) or complex IV [0.1 mM *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD)- 1 mM ascorbate] were added in the incubation medium. All substrates were free acids buffered to pH 7.3 with Tris. Experiments for the complex II were made in presence or absence of the complex I inhibitor rotenone (1μM) (Figure 1). The medium was then supplemented with 0.25 mM ADP to measure maximal rate of oxidative phosphorylation ( $V_{ADP}$ ). When respiration reached state 4 after complete phosphorylation of ADP, 0.5 μM oligomycin was added to measure oligomycin-insensitive respiration ( $V_{oligo}$ ), which eliminates the contribution of slow turnover of adenylates to basal respiration due to the presence of residual ATPase activity in the mitochondrial preparation. Respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio  $V_{ADP} / V_{oligo}$ , and the amount of ATP synthesized per molecule of oxygen consumed ( $P/O$ ) was calculated before state 4 was reached.

*Calcium challenge:*

Mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated at 22 °C in 2 ml of *buffer D* (in mM: 250 sucrose, 10 MOPS, 0.05 EGTA, 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) containing glutamate-malate (5 mM-2.5 mM) or succinate (5 mM) in the presence or absence of 1 μM rotenone. Changes in extramitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] were monitored fluorimetrically (Hitachi, F4500 spectrofluorometer) using Calcium-Green 5N (1 μM; excitation 505 nm, emission 535 nm) as described by Ichas et al. (30). Residual [Ca<sup>2+</sup>] was adjusted to the same level at the beginning of every experiment by adding a small amount of EGTA. Unless stated otherwise, Ca<sup>2+</sup> pulses (42 nmol/mg protein) were then added at 2-min intervals until a Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release was observed. Calcium retention capacity (CRC) was taken as the total amount of Ca<sup>2+</sup> accumulated by mitochondria before the Ca<sup>2+</sup> pulse triggering Ca<sup>2+</sup> release.

In some experiments, mitochondrial ΔΨ was measured under the same experimental conditions. For this purpose, Calcium-Green 5N was replaced with rhodamine 123 (0.2 μM; excitation 503 nm, emission 525 nm), and measurements were performed as described by Emaus et al. (21). Mitochondrial release of rhodamine 123 after uncoupling with 100 nM CCCP was taken as an index of ΔΨ. Mitochondrial swelling in response to Ca<sup>2+</sup> pulses was measured under the same experimental conditions, using light diffraction at a setting of 545 and 545 nm (29). Each experiment was performed either in the presence or the absence of 1 μM CsA. This concentration is commonly used (4, 22, 45) and is severalfold higher than that required for full inhibition of PTP in liver (~0.15 μM: (47)) and heart (~0.3 μM: (15, 17) mitochondria under standardized conditions of Ca<sup>2+</sup> loading.

*ROS production*

Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured fluorimetrically, as described by Servais et al. (53) (excitation 319 nm, emission 420 nm). Mitochondria (0.1 mg/ml)

were incubated in 2 ml of *buffer D* containing 5 U/mL of horseradish peroxidase (HRP) and 0.1 mM homovanilic acid (HVA). At the end of each test 2  $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added as an internal standard to allow calculation of endogenous ROS production by the respiratory chain.

#### *Pyridine nucleotide oxidation-reduction status*

The oxidation-reduction status of the mitochondrial PN pool was evaluated based on endogenous NAD(P)H fluorescence (excitation 340 nm, emission 460 nm). Mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated in 2 ml of *buffer D*, and redox state of PNs was measured in the presence of glutamate-malate (5 mM-2.5 mM) or succinate (5 mM)  $\pm$  rotenone (1  $\mu$ M). Redox state of PN was calculated as described by Arieli et al. (2): NAD(P)H ratio =  $(F_s - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min})$ , where  $F_s$  is the fluorescence measured after addition of respiratory substrates,  $F_{\min}$  is the baseline fluorescence of mitochondria measured in the absence of respiratory substrates, which represents PNs in their fully oxidized form, and  $F_{\max}$  is the fluorescence recorded after addition of 2  $\mu$ M antimycin A, which represents PNs in their fully reduced form. Preliminary experiments indicated that  $F_{\min}$  values measured with this method were similar to those obtained when mitochondria were uncoupled by the addition of 100 nM CCCP.

#### *Mitochondrial Adenylate Content*

Endogenous ATP and ADP contents were measured in neutralized perchloric acid extracts using a luciferin/luciferase assay described by Drew & Leeuwenburgh (20), with modifications. Briefly, ATP content was evaluated based on the light production [Planck's constant  $\times$  frequency ( $h\nu$ )] from the reactions luciferin + ATP  $\rightarrow$  luciferyl adenylate + PP<sub>i</sub> and luciferyl adenylate + O<sub>2</sub>  $\rightarrow$  oxyluciferin + AMP +  $h\nu$ .

In an aliquot of the same sample, ATP + ADP content was measured in a similar way after endogenous ADP was converted to ATP using excess amounts of pyruvate kinase (20 U/ml) and phosphoenolpyruvate (PEP: 5 mM) added directly in

the cuvette. ADP content was calculated by subtracting the bioluminescence decay curves obtained in both samples. For every assay, baseline light emission ( $h\nu$ ) before the addition of the sample was subtracted from the luminescent decay. In addition, it was verified that the presence of pyruvate kinase or PEP did not affect the relationship between ATP concentration and  $h\nu$ .

#### *Statistical analyses*

Results are expressed as means  $\pm$  SE. Two-tailed Student's *t*-tests were performed to assess statistical significance. When multiple comparisons were made, differences were compared with ANOVA and Tukey post hoc tests were performed to identify the location of significant differences. The Bonferonni correction was applied to the *P* value obtained to correct for multiple comparisons. A corrected *P* value  $< 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### *Morphometric parameters:*

In line with our previous work (14), the exercise training regimen used in the present study resulted in myocardial hypertrophy, as indicated by a significant increase in heart weight, ventricular weight (+11 %,  $P < 0.05$ ) and heart weight-to-body weight ratio (+10 %,  $P < 0.05$ ). No significant changes in body weight and daily food intake were observed between the experimental groups. Mitochondrial yields were similar in hearts from C and T rats (~16 mg/g ventricular tissue) (Table 1).

### *Mitochondrial respiration:*

Table 2 shows the results of experiments aimed at characterizing the effect of exercise training on basic respiratory parameters. In mitochondria respiring with substrates for complex I, II and IV, training was not associated with any changes in maximal ADP-stimulated and oligomycin-insensitive leak-driven respiration, RCR, and P/O. These data are consistent with previous reports showing that exercise training does not significantly affect oxidative capacity (43).

### *Ca<sup>2+</sup> challenge:*

Figure 2 shows the typical response of mitochondria energized with the complex I substrates glutamate and malate to series of Ca<sup>2+</sup> pulses. In these conditions, mitochondria accumulated  $134 \pm 7$  nmol Ca<sup>2+</sup>/mg protein before abrupt release of accumulated Ca<sup>2+</sup> occurred. The release of Ca<sup>2+</sup> was invariably accompanied by high-amplitude swelling. When the experiments were performed in the presence of the PTP inhibitor CsA (1  $\mu$ M), the amount of Ca<sup>2+</sup> required to trigger these effects significantly increased 3.5-fold ( $483 \pm 50$  nmoles/mg protein,  $P < 0.01$ ), indicating that these phenomena were caused by the opening of the PTP. However, as shown in Figure 3, in the presence of glutamate-malate, exercise training resulted only in a small increase in CRC that was not statistically significant ( $P = 0.15$ ) and CsA had the same effect as in mitochondria from control hearts.



Figure 3 also shows the results of similar experiments performed in mitochondria respiring with the complex II substrate succinate. In both experimental groups, CRC in presence of succinate was ~60-100% higher compared with that observed in the presence of glutamate-malate whether or not rotenone was present.

In contrast to what was observed in mitochondria energized with glutamate-malate, training significantly increased CRC by 45% in mitochondria energized with succinate substrates both in the presence ( $245 \pm 14$  vs  $327 \pm 25$  nmoles/mg protein,  $P < 0.05$ ) and the absence ( $215 \pm 25$  vs  $292 \pm 26$  nmoles/mg protein,  $P < 0.05$ ) of the complex I inhibitor rotenone. This difference remained unaltered in the presence of CsA, which increased CRC to a similar extent in both experimental groups. Importantly, training was not associated with changes in  $\text{Ca}^{2+}$  uptake kinetics in any of the conditions tested, as indicated by the calculated time to 50% uptake of the first two or three  $\text{Ca}^{2+}$  pulses ( $26.5 \pm 1.7$  s and  $29.6 \pm 2.0$  s in C and T mitochondria, respectively;  $n = 6$  in each group).

*PTP modulators:*

To gain insights on the mechanism(s) underlying this increase in CRC with complex II substrates, several physiological modulators of PTP gating were investigated. It is well established that the PTP behaves as a voltage-gated channel and that mild depolarization favors the open conformation in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  loading (7, 22, 60). For this reason, the effect of training on  $\Delta\Psi$  before PTP opening was determined. At baseline,  $\Delta\Psi$  was similar in mitochondria from C and T animals, as indicated by a comparable release of rhodamine 123 after addition of 100 nM CCCP ( $553 \pm 42$  vs  $580 \pm 64$  arbitrary fluorescence units in C and T groups, respectively). In addition, the transient depolarizations associated with the uptake of single  $\text{Ca}^{2+}$  pulses during the  $\text{Ca}^{2+}$  loading phase were of similar amplitude (Figure 4). As expected, once the pore opened, an abrupt and complete loss of  $\Delta\Psi$  was observed in both experimental groups. However, consistent with the CRC data,

significantly more  $\text{Ca}^{2+}$  was required to trigger this effect in mitochondria from T compared with C animals.

Figure 5 shows the results of experiments in which ROS production was measured. In line with previous studies (57), mitochondria generated a significant amount of ROS in presence of succinate alone (Figure 5, A and B). Addition of rotenone decreased ROS production by half, consistent with the idea that succinate leads to ROS production at the level of the FeS center of complex I through reverse electron flow (57). Subsequent addition of antimycin A led to a large increase in ROS production, which in the presence of rotenone occurs mainly at the level of complex III. However, training did not alter steady-state ROS production with succinate alone and in the presence of both inhibitors. Similarly, training did not significantly affect ROS production when mitochondria were energized with glutamate-malate whether or not electron flow through complex I was inhibited by rotenone (Figure 5, C and D).

Figure 6 shows the results from experiments in which the redox state of PNs was measured in mitochondria from C and T animals. After addition of mitochondria in the absence of respiratory substrate, endogenous autofluorescence of PNs stabilized at a low level in both experimental groups (Figure 6A). Addition of succinate led to a rapid reduction of PNs, and subsequent inhibition of electron flow with antimycin A led to the complete reduction of the PN pool. In some experiments 100 nM CCCP was added instead of antimycin A. Under this condition, fluorescence returned to the level observed in mitochondria in the absence of respiratory substrate (data not shown). Figure 6B shows the steady-state NAD(P)H ratio computed from several experiments in mitochondria respiring with succinate in the presence and absence of rotenone. No significant differences were observed between the experimental groups in any of the conditions tested.

Table 3 shows the endogenous adenine nucleotide content measured in frozen mitochondrial extracts from C and T animals. Training did not significantly alter the residual ATP, ADP, and total adenylate contents or the ATP-to-ADP ratio.

## DISCUSSION

Results from the present study provide evidence that in heart mitochondria sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening is influenced by the type of respiratory substrate oxidized, with complex I donors acting as sensitizers compared with complex II substrates. In addition, the present results indicate that regular exercise training can decrease the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening when mitochondria are energized with complex II substrates. This effect of training was observed in the absence of changes in the physiological modulators of PTP opening investigated.

### *Substrate specific regulation of the PTP:*

Fontaine et al. (22) showed that in skeletal muscle mitochondria CRC is three- to fourfold lower in mitochondria energized with glutamate-malate compared with succinate. This marked difference in CRC was shown to be due to the fact that the factors contributing to PTP opening are different in the two experimental conditions. Indeed, in the presence of complex I substrates the electron flow through this complex, independent of other regulators (i.e., redox state of PNs,  $\Delta\Psi$ , pH, ROS production), appeared to be the main factor regulating PTP opening by acting as a potent sensitizer (6, 22, 40). In contrast, when complex I was bypassed with succinate the mechanism was largely inactive and the contribution of other regulators to PTP opening was unmasked. Results from the present study are in line with these data. Indeed, in both experimental groups a substantially lower CRC was observed in presence of glutamate-malate compared with succinate. Our data thus indicate that, similar to what is observed in skeletal muscle, the electron flow through complex I sensitizes heart mitochondria to PTP opening.

### *Training-induced alteration in $\text{Ca}^{2+}$ handling:*

To our knowledge, the impact of exercise training on  $\text{Ca}^{2+}$  handling by heart mitochondria has only been investigated in two studies (50, 56), and the effect on the PTP was not directly assessed. Sordahl et al. (56) reported that the rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by isolated heart mitochondria energized with succinate was unchanged after training

in dogs. Similar findings were reported by Penpargkul et al. (50) in rodents in response to swim training. Results from the present study are in line with these findings. Indeed,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake kinetics measured during the first two or three  $\text{Ca}^{2+}$  pulses of the  $\text{Ca}^{2+}$  challenge did not differ between the two experimental groups whether mitochondria were energized with complex I or II substrates. These data thus suggest that training has little effect on the electrophoretic mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in heart mitochondria.

In the study by Sordahl et al. (56), training was found to decrease the capacity of mitochondria to accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  when energized with succinate. At the time this study was published, the existence of the PTP and the inhibitory effect of cyclosporins on pore opening were unknown. However, given the experimental conditions used, this phenomenon was likely caused by a premature opening of the PTP in mitochondria from trained animals. As for the study by Penpargkul et al. (50), the experimental conditions used did not allow observation of a permeability transition.

In contrast to the results from Sordahl et al. (56), data from the present study indicate that in mitochondria from T rats the amount of  $\text{Ca}^{2+}$  required to trigger PTP opening was significantly 45% higher in the presence of succinate both in the presence and in the absence of rotenone. In addition, CsA increased CRC in both experimental groups but did not abolish the effect of training. These results thus indicate that, in our conditions, training was able to decrease the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening in the presence of complex II substrates. In addition, the fact that the effect of training was not abolished by CsA used at a concentration threefold in excess of that required to fully inhibit PTP opening (15, 17, 47) suggests that the effect of training is not related to a reduction in the expression of cyclophilin D or its interaction with other PTP components (3, 4). Indeed, changes in the expression of cyclophilin D are known to translate into an altered potency of CsA at inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening (3, 4, 45, 52).

Our results also indicate that, in contrast to what was observed with succinate, no significant difference between C and T groups was observed for CRC in the presence of complex I substrates. As mentioned above, PTP opening is strongly regulated by electron flow through complex I, which sensitizes mitochondria to permeability transition (6, 22, 40). Our data thus indicate that training did not protect against this sensitizing effect. In contrast, when complex I was bypassed a protective effect of training, probably through other regulators of PTP opening, was unmasked.

*Effect of training on physiological modulators of PTP opening:*

To our knowledge, there are no data available in the literature concerning the effect of training on parameters involved in the regulation of the PTP in the heart. In the present study, we therefore determined whether the training-induced increase in the resistance to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening observed with complex II substrates was accompanied by changes in selected physiological modulators of PTP gating and/or in mitochondrial respiratory activity.

$\text{Ca}^{2+}$ -induced permeability transition is modulated by a variety of physiological effectors. The occurrence of PTP opening at a given  $\text{Ca}^{2+}$  load is reduced when  $\Delta\Psi$  is increased because the PTP behaves as a voltage-gated channel sensitive to changes in  $\Delta\Psi$  over a range of 180–120 mV (7). Matrix adenine nucleotides are also potent inhibitors of PTP opening, with ADP exerting a stronger inhibitory effect than ATP (16, 60). Maintenance of the PN pool at a high reduction state is another factor known to decrease PTP opening induced by  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{P}_i$ , probably through mechanisms involving direct interaction of PNs with the PTP and oxidation of critical SH residues of pore-forming proteins (6, 60). Low levels of ROS production (12, 26) as well as an acidic pH (8, 48) will also reduce the occurrence of PTP opening. Finally, the sensitivity of the PTP to  $\text{Ca}^{2+}$  was shown to be modulated by members of the Bcl-2 family of proteins, the proapoptotic Bid and

Bax and the antiapoptotic Bcl-2 and Bcl<sub>XL</sub> acting as facilitators and repressors of pore opening, respectively (11, 38, 44, 46, 49).

However, in the present study we did not find evidence indicating that changes at the level of these PTP modulators could account for the increased resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced PTP opening observed. Indeed, baseline  $\Delta\Psi$  at steady state as well as the amplitude of the transient depolarizations associated with the uptake of single Ca<sup>2+</sup> pulses were similar in both groups, suggesting that  $\Delta\Psi$  before PTP opening was not affected by training. Endogenous ATP and ADP content as well as the ATP-to-ADP ratio were also similar in mitochondria from the C and T groups. In addition, the redox state of PNs measured was unchanged. As for matrix pH, it is unlikely to be a factor since the high P<sub>i</sub> concentration used during the Ca<sup>2+</sup> challenge experiments prevents any fluctuations in matrix pH secondary to changes in respiration (22).

In the heart, several studies have shown that training results in a significant increase in tissue content of enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems, including some that are found in mitochondria (33, 36, 55). However, there are apparently no data available on the effect of training on the actual rate of ROS production by active mitochondria. Moreover, data available in skeletal muscle mitochondria on this question are conflicting, showing either a reduction (58) or no change (53) in ROS production after training.

In the present study, the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of mitochondria respiring with complex I or II substrates under state 4 conditions was not significantly affected by training. In addition, reduction of respiratory chain complexes with rotenone or antimycin A, which induce a large increase in ROS production, had similar effects in both experimental groups. These results would thus suggest that altered ROS production is not responsible for the increased CRC observed in mitochondria after training. However, ROS production could not be accurately measured during the Ca<sup>2+</sup>

challenge because of artifactual changes in the fluorescence of HVA in these conditions (5). Therefore, the present data cannot rule out the possibility that during the  $\text{Ca}^{2+}$  challenge ROS production was lower in trained mitochondria because of a reduced ability of  $\text{Ca}^{2+}$  to increase ROS production through its action on the TCA cycle and/or on several components of the respiratory chain (12).

Together, results from the present study indicate that mitochondria isolated from trained hearts are more resistant to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening when energized with succinate. This adaptation could potentially be beneficial to the heart in the setting of ischemia-reperfusion, a situation in which exercise was shown to be protective (9, 10, 13). The mechanisms underlying this increased resistance remain obscure (6, 22, 40) but are apparently not related to changes in endogenous adenylate content, alterations in respiratory chain function, redox state of PNs, or ROS production. One possibility is that this phenomenon is caused by changes in the expression of anti- and proapoptotic members of the Bcl-2 family of proteins known to modulate  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the PTP. Indeed, the balance between Bcl-2 and Bcl<sub>XL</sub> on the one hand and Bax on the other hand was recently shown to be increased after training (34, 54). However, this hypothesis remains to be tested.



**REFERENCES**

1. **Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, and Ovize M.** Preconditioning delays  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 61: 115-122, 2004.
2. **Arieli Y, Gursahani H, Eaton MM, Hernandez LA, and Schaefer S.** Gender modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in cardiac mitochondria. *J Mol Cell Cardiol* 37: 507-513, 2004.
3. **Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, and Molkenin JD.** Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434: 658, 2005.
4. **Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, and Bernardi P.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J Biol Chem* 280: 18558-18561, 2005.
5. **Batandier C, Leverve X, and Fontaine E.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279: 17197-17204, 2004.
6. **Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155, 1999.
7. **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* 267: 8834-8839, 1992.
8. **Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, and Zoratti M.** Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* 267: 2934-2939, 1992.
9. **Bowles DK, Farrar RP, and Starnes JW.** Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol* 263: H804-809, 1992.

10. **Bowles DK and Starnes JW.** Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol* 76: 1608-1614, 1994.
11. **Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclohier H, Reed JC, and Kroemer G.** Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19: 329-336, 2000.
12. **Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, and Sheu SS.** Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-833, 2004.
13. **Brunner M, Moeslinger T, and Spieckermann PG.** Regulation of cyclosporin A sensitive mitochondrial permeability transition by the redox state of pyridine nucleotides. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128: 31-41, 2001.
14. **Burelle Y, Wambolt RB, Grist M, Parsons HL, Chow JC, Antler C, Bonen A, Keller A, Dunaway GA, Popov KM, Hochachka PW, and Allard MF.** Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1055-1063, 2004.
15. **Clarke SJ, McStay GP, and Halestrap AP.** Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 277: 34793-34799, 2002.
16. **Crompton M.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249, 1999.
17. **Crompton M, Ellinger H, and Costi A.** Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 255: 357-360., 1988.
18. **Di Lisa F and Bernardi P.** Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem* 184: 379-391, 1998.
19. **Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, and Bernardi P.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and

- cytosolic  $\text{NAD}^+$  and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276: 2571-2575, 2001.
20. **Drew B and Leeuwenburgh C.** Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R1259-1267, 2003.
  21. **Emaus RK, Grunwald R, and Lemasters JJ.** Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850: 436-448, 1986.
  22. **Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, and 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* 273: 12662-12668, 1998.
  23. **Griffiths EJ and Halestrap AP.** Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 307: 93-98, 1995.
  24. **Griffiths EJ and Halestrap AP.** Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25: 1461-1469, 1993.
  25. **Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, and O'Toole A.** Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28: 170-177, 2000.
  26. **Harris EJ, Booth R, and Cooper MB.** The effect of superoxide generation on the ability of mitochondria to take up and retain  $\text{Ca}^{2+}$ . *FEBS Lett* 146: 267-272, 1982.
  27. **Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, and Yellon DM.** Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 55: 534-543., 2002.
  28. **Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, and Duchon MR.** Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H841-849, 2004.

29. **Hunter DR and Haworth RA.** The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 195: 453-459, 1979.
30. **Ichas F, Jouaville, L.S., Mazat, J.P.** Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89: 1145-1153, 1997.
31. **Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, and Halestrap AP.** Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 549: 513-524, 2003.
32. **Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, and Halestrap AP.** Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 45: 360-369., 2000.
33. **Ji LL, Fu RG, Mitchell EW, Griffiths M, Waldrop TG, and Swartz HM.** Cardiac hypertrophy alters myocardial response to ischaemia and reperfusion in vivo. *Acta Physiol Scand* 151: 279-290, 1994.
34. **Kang PM, Yue P, Liu Z, Tarnavski O, Bodyak N, and Izumo S.** Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H72-80, 2004.
35. **Kerr PM, Suleiman MS, and Halestrap AP.** Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am J Physiol* 276: H496-502, 1999.
36. **Kihlstrom M.** Protection effect of endurance training against reoxygenation-induced injuries in rat heart. *J Appl Physiol* 68: 1672-1678, 1990.
37. **Kim J-S, He L, and Lemasters JJ.** Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 463, 2003.
38. **Kowaltowski AJ, Vercesi AE, and Fiskum G.** Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death Differ* 7: 903-910, 2000.

39. **Lemasters J, Qian T, Bradham C, Brenner D, Cascio W, Trost L, Nishimura Y, Nieminen A-L, and Herman B.** Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 31: 305, 1999.
40. **Leverve XM and Fontaine E.** Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52: 221-229., 2001.
41. **Mattson MP and Kroemer G.** Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* 9: 196-205, 2003.
42. **McElroy CL, Gissen SA, and Fishbein MC.** Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* 57: 958-962, 1978.
43. **Moore RL and Palmer BM.** Exercise training and cellular adaptations of normal and diseased hearts. *Exerc Sport Sci Rev* 27: 285-315, 1999.
44. **Murphy RC, Schneider E, and Kinnally KW.** Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 497: 73-76, 2001.
45. **Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, and Tsujimoto Y.** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652-658, 2005.
46. **Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, and Tsujimoto Y.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14681-14686, 1998.
47. **Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, and 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.
48. **Nicolli A, Petronilli V, and Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that

the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry* 32: 4461-4465, 1993.

49. **Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL, and Marcineviciute A.** Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 274: 31734-31739, 1999.
50. **Penpargkul S, Schwartz A, and Scheuer J.** Effect of physical conditioning on cardiac mitochondrial function. *J Appl Physiol* 45: 978-986, 1978.
51. **Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, and Jessup J.** Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 275: R1468-1477, 1998.
52. **Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, and Korsmeyer SJ.** Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *PNAS* 102: 12005-12010, 2005.
53. **Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, Sempore B, Lavoie JM, and Favier R.** Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35: 24-32, 2003.
54. **Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, and Alway SE.** Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 18: 1150-1152, 2004.
55. **Somani SM, Frank S, and Rybak LP.** Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 627-634, 1995.
56. **Sordahl LA, Asimakis GK, Dowell RT, and Stone HL.** Functions of selected biochemical systems from the exercised-trained dog heart. *J Appl Physiol* 42: 426-431, 1977.
57. **Turrens JF.** Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17: 3-8, 1997.

58. **Venditti P, Masullo P, and Di Meo S.** Effect of training on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by mitochondria from rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 372: 315-320., 1999.
59. **Zamzami N and Kroemer G.** Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization - the (w)hole story? *Current Biology* 13: R71-R73, 2003.
60. **Zoratti M and Szabo I.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176, 1995.
61. **Zoratti M, Szabo I, and De Marchi U.** Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta* 1706: 40-52, 2005.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research. YB is a Junior Investigator of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MM is supported by a Ph.D scholarship from FRSQ. The authors wish to thank Dr. Éric Fontaine for helpful discussions and Véronique Giroux and Sébastien Martin for their technical assistance.



**Table 1: Morphometric data and mitochondrial isolation yield in sedentary control and exercise trained rats.**

|  | Control     | Trained       |
|--|-------------|---------------|
| Body weight (g)  | 343 ± 14    | 347 ± 10      |
| Heart weight (mg)                                      | 920 ± 35    | 1020 ± 18 *   |
| Heart weight / Body weight (mg/g)                      | 2.69 ± 0.05 | 2.95 ± 0.07 # |
| Ventricular weight (mg)                                | 784 ± 23    | 871 ± 19 *    |
| Mitochondrial isolation yield<br>(mg prot/g ventricle) | 15.7 ± 1.0  | 16.5 ± 0.6    |
| Average food intake (g/day)                            | 20.9 ± 0.7  | 20.6 ± 0.3    |

Values are means ± SE for 8 animals in each group. \* Significantly different from control ( $P < 0.01$ ). # Significantly different from control ( $P < 0.05$ ).

**Table 2: Effect of exercise on mitochondrial respiration.**

| Conditions         | Substrates | Control     | Trained     |
|--------------------|------------|-------------|-------------|
| $V_{\text{oligo}}$ | GM         | 14.1 ± 0.4  | 13.3 ± 0.7  |
|                    | SR         | 30.3 ± 2.4  | 28.2 ± 2.6  |
|                    | S          | 27.1 ± 1.6  | 25.8 ± 2.1  |
|                    | TMPD-Asc   | 56.2 ± 3.7  | 44.1 ± 3.1  |
| $V_{\text{ADP}}$   | GM         | 101.4 ± 8.8 | 91.5 ± 9.6  |
|                    | SR         | 96.3 ± 8.0  | 104.6 ± 4.8 |
|                    | S          | 68.7 ± 9.2  | 50.9 ± 7.6  |
|                    | TMPD-Asc   | 89.9 ± 4.8  | 76.8 ± 5.0  |
| RCR                | GM         | 7.3 ± 0.5   | 6.7 ± 0.5   |
|                    | SR         | 3.3 ± 0.3   | 4.3 ± 0.6   |
|                    | S          | 2.5 ± 0.3   | 2.3 ± 0.5   |
|                    | TMPD-Asc   | 1.6 ± 0.04  | 1.8 ± 0.1   |
| P/O                | GM         | 2.5 ± 0.2   | 2.9 ± 0.2   |
|                    | SR         | 1.5 ± 0.1   | 1.4 ± 0.2   |
|                    | S          | 2.2 ± 0.4   | 2.1 ± 0.2   |
|                    | TMPD-Asc   | 1.7 ± 0.2   | 1.6 ± 0.2   |

Values are means ± SE for 4 (control) to 7 (trained) animals; all measurements were carried out in duplicates. Basal oligomycin-insensitive and ADP-stimulated respiration ( $V_{\text{oligo}}$  and  $V_{\text{ADP}}$ , respectively;  $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ ), respiratory control ratio (RCR;  $V_{\text{ADP}}/V_{\text{oligo}}$ ), and P/O of mitochondria energized with glutamate-malate (GM), succinate with or without rotenone (SR and S, respectively) and *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine-ascorbate (TMPD-Asc) are shown.

**Table 3: Adenylate content of heart mitochondria from control and trained rats.**

| Conditions | ATP<br>(nmol/mg prot) | ADP<br>(nmol/mg prot) | Adenylate content<br>(nmol/mg prot) | ATP/ADP ratio |
|------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|---------------|
| Control    | 1.12 ± 0.14           | 0.76 ± 0.22           | 1.88 ± 0.33                         | 2.03 ± 1.03   |
| Trained    | 1.14 ± 0.09           | 0.77 ± 0.16           | 1.91 ± 0.23                         | 1.60 ± 0.20   |

Values are means ± SE for 6 separate mitochondrial preparations in each group. Endogenous ADP, ATP, and total adenylate content and ATP-to-ADP ratio measured in perchloric acid-extracted mitochondrial aliquots are shown.

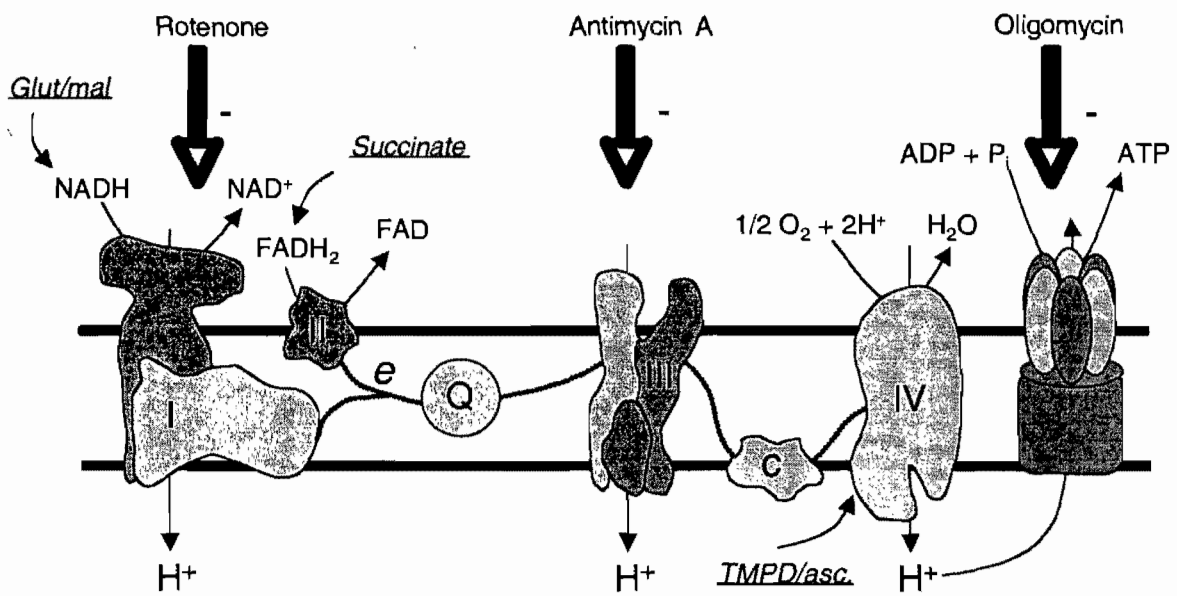


Figure 1

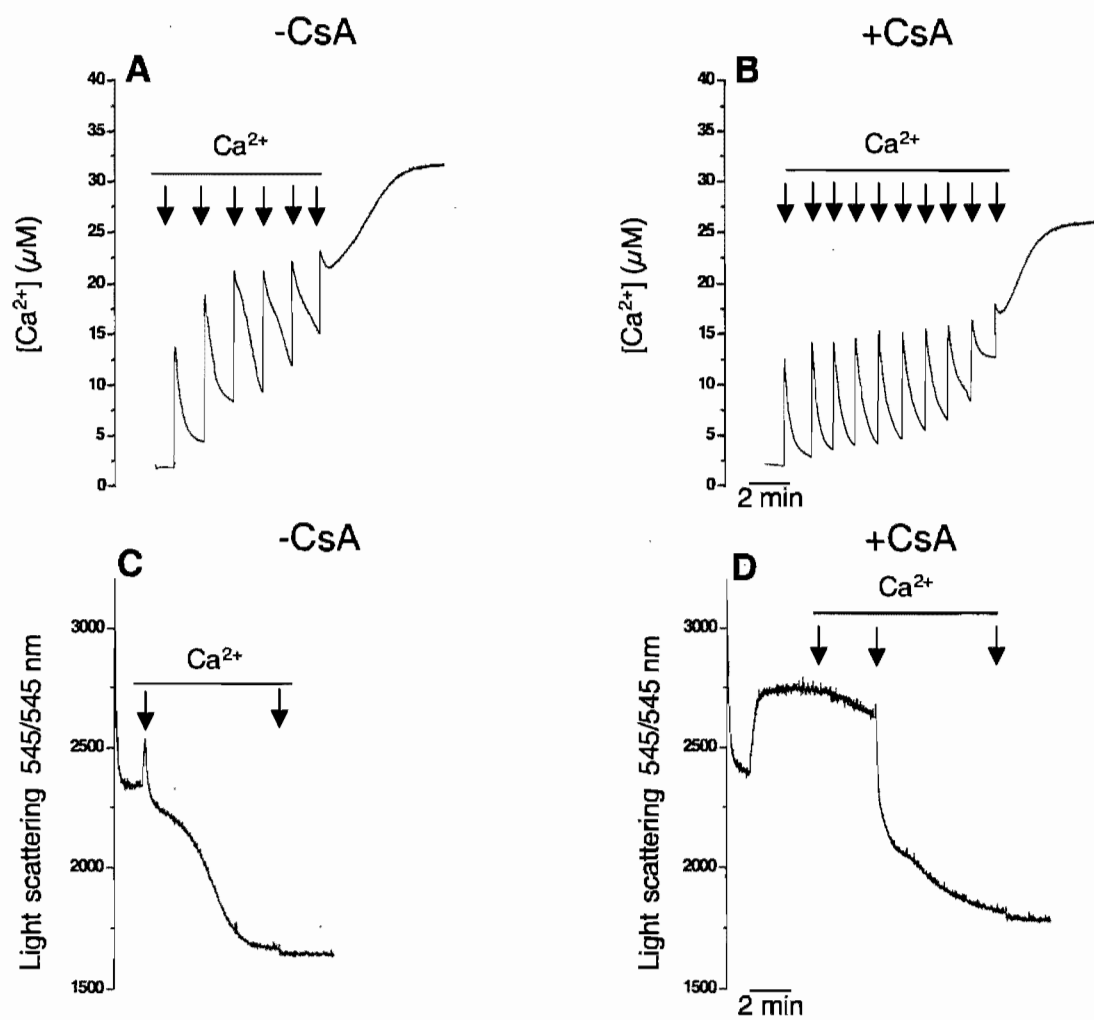


Figure 2

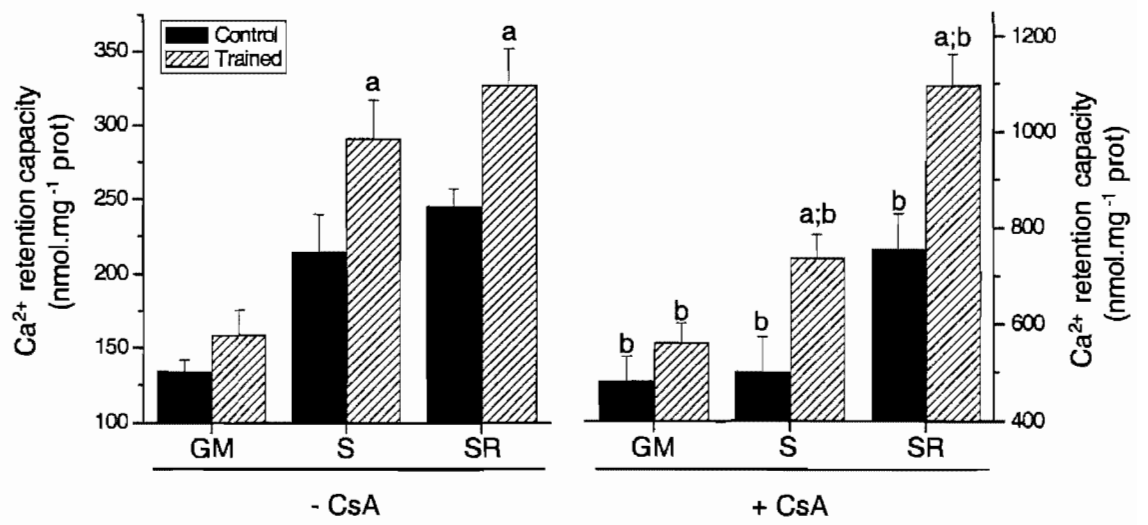


Figure 3

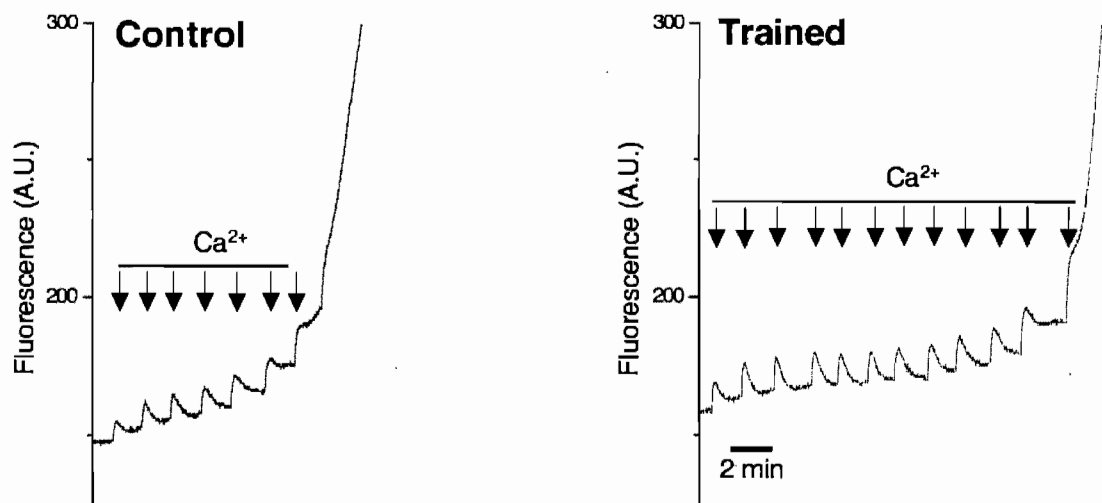


Figure 4

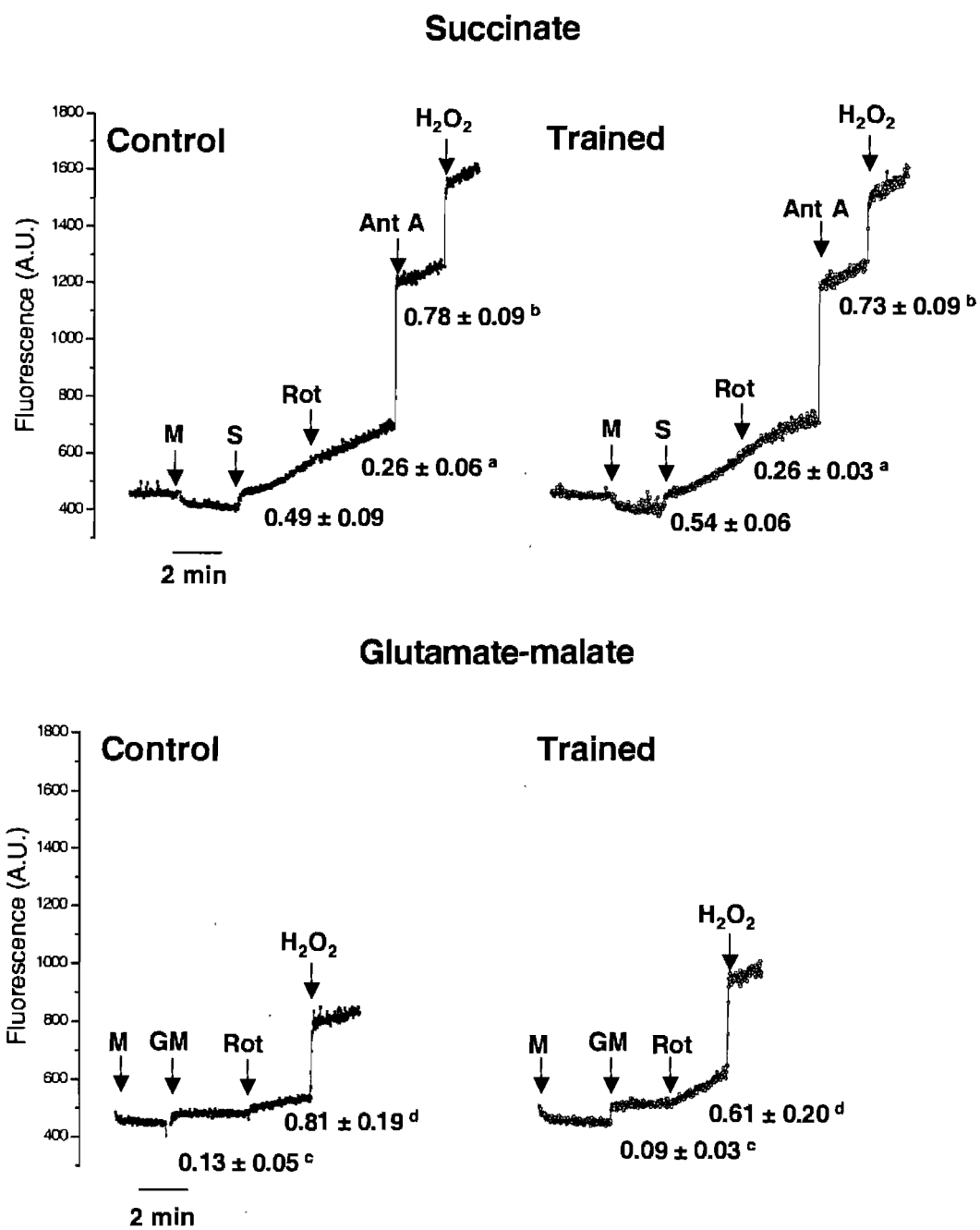


Figure 5



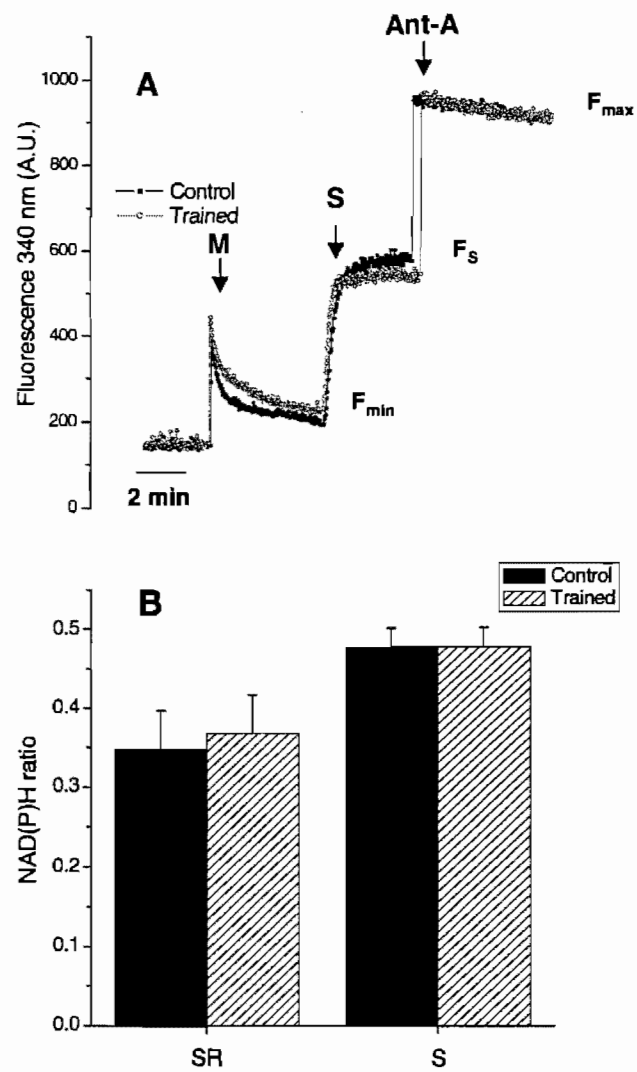


Figure 6

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Overview of respiratory substrates and inhibitors used:** the respiratory substrates providing electrons to complex I, II, and IV are underlined. The various inhibitors (rotenone, antimycin A, and oligomycin) used are shown over their respective sites of action. Glut/mal, glutamate-malate; TMPD/asc, *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD)-1mM ascorbate; Q, ubiquinone; C, cytochrome c.

**Figure 2: Mitochondrial response to a train of Ca<sup>2+</sup> pulses.** Typical Calcium-Green 5N (A and B) and light scattering at 545 nm (C and D) of mitochondria energized with glutamate-malate (5 mM-2.5 mM). Tracings show progressive Ca<sup>2+</sup> accumulation followed by release of accumulated Ca<sup>2+</sup> and high amplitude swelling. The presence of 1 μM cyclosporin A (CsA; B and D) doubles the amount of Ca<sup>2+</sup> required to trigger these effects, indicating that these phenomena are related to permeability transition pore (PTP) opening. Each arrow indicates the addition of a Ca<sup>2+</sup> pulse of 42 and 210 nmol/mg for the Calcium-Green 5N and swelling experiments, respectively. [Ca<sup>2+</sup>], Ca<sup>2+</sup> concentration.

**Figure 3: Effect of exercise on PTP sensitivity to Ca<sup>2+</sup> with complex I and II substrates.** Ca<sup>2+</sup> retention capacity (in nmol/mg protein) of control (C) and exercise trained (T) mitochondria energized with glutamate-malate (GM) and succinate in absence (S) and presence (SR) of 1 μM rotenone is shown. Experiments were performed in the absence (GM, S and SR) or presence (GM+CsA, S+CsA and SR+CsA) of 1 μM CsA. Values are means ± SE for at least 7 separate experiments in the C and T groups, respectively. a Significantly different from control ( $P < 0.05$ ); b Significantly different compared with - CsA ( $P < 0.01$ ).

**Figure 4: Changes in membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) in response to  $\text{Ca}^{2+}$  pulses in mitochondria from control and trained animals.** Representative traces of changes in  $\Delta\Psi$ , measured with rhodamine 123 during  $\text{Ca}^{2+}$  challenge experiments in the presence of succinate. Each arrow indicates the addition of a calcium pulse of 42 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein. AU, arbitrary units.

**Figure 5: Effect of exercise on mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  production.** Representative traces of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in heart mitochondria of control (A and C) and trained (B and D) animals when energized with succinate (A and B) or glutamate-malate (C and D) are shown. Numbers below traces represent the rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in nanomoles per minute per milligram of protein. Data are means  $\pm$  SE for at least 7 experiments in each group. M, mitochondria; GM: glutamate-malate; S, succinate; Rot, rotenone (1 $\mu\text{M}$ ); Ant A, antimycin-A (2  $\mu\text{M}$ ). a Significantly different from succinate alone ( $P < 0.01$ ); b Significantly different from succinate in presence of rotenone ( $P < 0.01$ ); c Significantly different from succinate alone ( $P < 0.01$ ); d Significantly different from glutamate-malate alone ( $P < 0.01$ ).

**Figure 6: Effect of exercise on redox state of pyridine nucleotides (PNs).** A: representative traces of PN fluorescence at 460 nm in heart mitochondria of control and trained rats when energized with succinate. B: the redox state in presence of succinate in the absence and presence of rotenone (S and SR). Redox state is expressed as the ratio  $(F_S - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min})$ . Fluorescence levels corresponding to these values are shown in A (see methods for further details). Values are means  $\pm$  SE for 6 separate experiments in each group.

## 2.2. Article 2

### Titre

Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress.

### Auteurs

Mariannick Marcil, Alexis Ascah, Jimmy Matas, Sonia Bélanger, Christian F. Deschepper et Yan Burelle

### Journal

Publié le 1<sup>er</sup> décembre 2006 dans *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (J Mol Cell Cardiol. 2006 Dec; 41(6): 998-1009)

Reproduit avec la permission de Elsevier Limited

**COMPENSATED VOLUME OVERLOAD INCREASES THE VULNERABILITY OF HEART  
MITOCHONDRIA WITHOUT AFFECTING THEIR FUNCTIONS IN ABSENCE OF STRESS.**

Mariannick Marcil<sup>1</sup>, Alexis Ascah<sup>1</sup>, Jimmy Matas<sup>1</sup>, Sonia Bélanger<sup>2</sup>, Christian F. Deschepper<sup>2</sup> and Yan Burelle<sup>1</sup>

1 Département de kinésiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

2 Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Running head: mitochondrial vulnerability in cardiac overload

Send correspondence to:

Yan Burelle, Ph.D

Université de Montréal


Dept. of kinesiology

P.O. Box 6128 Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Phone : 514-343-6083

Fax : 514-343-2181

E-mail 

**ABSTRACT**

Although mitochondrial dysfunction has often been associated to heart failure, it has been suggested that it may represent only a late phenomenon in the disease process. We hypothesized that mitochondrial vulnerability to stress could be impaired in hypertrophied but non-decompensated hearts at a time when overt mitochondrial defects are not yet apparent. In the present study, hypertrophic remodeling was induced by means of an aorto-caval fistula (ACF) in WKHA rats and experiments were performed 12 weeks post surgery. At this time, ACF animals displayed normal contractile function, tissue oxidative capacity as well as mitochondrial membrane potential and respiratory function. However, compared to sham, mitochondria from ACF animals were more vulnerable to anoxia-reoxygenation injury *in vitro* as indicated by a greater impairment of oxidative phosphorylation and a greater dependence of respiration on exogenous NADH. Addition of the PTP inhibitor CsA restored respiratory function to the level observed in mitochondria from sham animals. Likewise, mitochondria from ACF displayed a greater sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced PTP opening *in vitro* compared to their sham counterparts. In addition to the greater vulnerability of mitochondria *in vitro*, mitochondrial PTP opening measured *in situ* in perfused hearts was greater following ischemia-reperfusion in ACF animals than in their sham counterparts. This was associated with a more impaired functional recovery and greater tissue damage during reperfusion in hearts from ACF vs sham. Taken together, these results indicate that, in response to volume overload, mitochondria may display increased vulnerability in the absence of any sign of dysfunction under baseline unstressed conditions, at a time when adverse ventricular remodeling is observed but systolic dysfunction and decompensation have not occurred yet.

**Keywords:** hypertrophy, mitochondria, oxidative phosphorylation, hypoxia/anoxia, heart failure

## INTRODUCTION

Hypertrophic ventricular remodeling is a response of the heart to numerous forms of cardiac stresses, including increases in workload, loss of contractile mass from prior infarction and/or neuroendocrine activation [1]. It is accompanied by a host of changes that take place at the level of cardiomyocytes (including alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  handling, sarcomere function, of several signaling pathways and energy metabolism) and the extracellular matrix [1-3]. However, some (if not most) of these changes appear to be maladaptive as left ventricular hypertrophy associates with increased mortality and morbidity [4, 5] and may often progress towards systolic heart failure [1].

Despite the known association between left ventricular hypertrophy (LVH) and heart failure, the mechanisms involved in the transition from compensated hypertrophy to decompensated cardiac failure remain poorly understood [1, 2]. Among other factors, the potential roles of changes in energy metabolism, particularly at the level of mitochondria, have been the topic of numerous investigations. Several studies have reported that systolic heart failure is accompanied by alterations in mitochondrial ultrastructure and function, including a reduction in the activity of respiratory chain enzymes and capacity for oxidative phosphorylation [6-11]. However, these changes were all observed in hearts that had already reached end-stage failure, which led to the suggestion that mitochondrial dysfunction represents a late phenomenon in the disease process [12].

In contrast, very little information is available on whether or not the ability of mitochondria to tolerate stress is altered in hearts undergoing pathological ventricular remodeling. This is of importance as left ventricular dysfunction, once established as a consequence of a primary event, can deteriorate progressively over a period of months or years before eventually culminating into the syndrome of congestive heart failure [13] and thus exposes the heart to prolonged periods of stress. Recently, it has been reported that mitochondria isolated from transgenic mice overexpressing

TNF $\alpha$  in a cardiac-restricted fashion display a lower tolerance to oxidative stress and an increased susceptibility to permeability transition pore opening (PTP) [8], an event that is critically involved in mitochondria-mediated cell death [14-18]. However, the hearts of these animals already displayed severe systolic dysfunction, and their mitochondria displayed structural damage as well as a severely compromised oxidative capacity. The study therefore did not resolve the question of whether increased mitochondrial vulnerability to stress can be observed at earlier stages of the disease and whether it can precede the occurrence of overt mitochondrial defects.

In the present study we therefore used a well-described model of compensated volume overload induced by means of an aorto-caval fistula (ACF) in rats to determine the response of isolated mitochondria to anoxia-reoxygenation and PTP opening *in vitro*. The vulnerability to mitochondrial dysfunction and pore opening was also determined *in situ* in hearts submitted to ischemia-reperfusion. The ACF model was chosen because it causes cardiomyocytes to be exposed to continuous stress for several weeks and yet show no signs of systolic dysfunction [19, 20], the latter developing at a later stage when contractile reserves have been depleted [21].



## METHODS

### *Animal care:*

All experiments on animals were approved by the Université de Montréal Institutional Animal Care Committee and conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. The male inbred WKHA/Cfd rats used in this study originated from a colony maintained at the IRCM, as registered with the Institute of Laboratory Animal Resources. We had previously verified in this strain that, with 12 weeks of ACF, eccentric hypertrophy developed in a reliable and reproducible fashion and in the absence of systolic dysfunction [22].

### *Induction of chronic volume overload and isolation of mitochondria:*

Induction of the aorto-caval fistula was performed at 10 weeks of age as described elsewhere [23]. For measurements of mitochondrial performance *in vitro*, animals were anesthetized (ketamine / xylazine: 61.5/7.7 mg/kg, i.p.) 12 weeks after surgery, and the hearts were dissected out rapidly. Biventricular weight and the individual weight of the left (LV, plus septum) and right ventricles (RV) were determined. A small piece (100 mg) of the LV was immediately frozen in liquid nitrogen, and the remaining LV tissue was used for isolation of mitochondria. Each ACF animal was paired with one sham-operated control on the same day of experimentation.

Heart mitochondria were prepared as described previously [24]. Hearts were rapidly excised and immersed into ice-cold isolation medium (buffer A, in mM: 300 sucrose, 10 Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride (Tris-HCl), 1 Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid (EGTA), pH 7.3) and weighed. Ventricular tissue was minced with scissors in 5 ml of buffer A supplemented with 0.2% fatty acid free bovine serum albumin (BSA) and homogenized using a Polytron tissue tearer (~3 s at a setting of 3). The homogenate was then incubated with the protease Nagarse (1.5 mg/g) for 5 min and further homogenized at the same settings. The homogenate volume was completed to 30 ml

with Buffer A + 0.2% BSA and centrifuged at 800 x g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was decanted and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. The pellet obtained was resuspended in buffer B (in mM: 300 sucrose, 0.5 EGTA, 10 Tris-HCl, pH 7.3) and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. After repeating this washing step twice, the final mitochondrial pellet was resuspended in 0.3 ml of buffer B to a protein concentration of ~20 mg/ml. All procedures were carried out at 4°C. Protein determinations were performed using the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA), with bovine serum albumin as a standard.

*Anoxia-reoxygenation in vitro:*

Mitochondria (2 mg of protein) were placed in an air-tight, temperature-controlled chamber (30°C) equipped with an oxygen electrode in 1 ml of buffer A (in mM: 110 KCl, 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 MOPS, 5 glutamate, and 2.5 malate, pH 7.4) that had previously been equilibrated at ambient *p*O<sub>2</sub> (~250 nmol O<sub>2</sub>/ml). Mitochondria consumed the oxygen available in ~ 5 min, and anoxia was pursued for a further 20 min (Figure 2). Reoxygenation was produced by removing the sealed cap and gently blowing room air at the surface of the stirred mitochondrial suspension in order to reach a stable *p*O<sub>2</sub> within 1-2 min. After 10 and 20 min of reoxygenation a 300 µl aliquot of the suspension was transferred in a second chamber for the assessment of mitochondrial respiratory function as described below. Experiments were performed in the absence and presence of the PTP inhibitor cyclosporin A (CsA, 1 µM). *p*O<sub>2</sub> values were constantly monitored and remained stable at ~ 100 nmol O<sub>2</sub>/ml during the first 10 min of reoxygenation in both experimental groups (97 ± 9 and 96 ± 9 nmol O<sub>2</sub>/ml in sham and ACF respectively, *n*= 7). After removal of the first 300 µl aliquot, equilibration with ambient air was facilitated and further increased *p*O<sub>2</sub> to reach ~ 130 nmol O<sub>2</sub>/ml at 20 min of reoxygenation (136 ± 7 and 133 ± 9 nmol O<sub>2</sub>/ml in sham and ACF respectively, *n*= 7).

*Mitochondrial respiratory function:*

Mitochondria (0.3 mg of protein) were incubated in 1 ml of buffer A. After performing basal ADP-restricted measurements ( $V_0$ ), 1 mM ADP was added to measure the maximal rate of oxidative phosphorylation ( $V_{ADP}$ ) in the presence of glutamate-malate (5:2.5 mM). Respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio  $V_{ADP} / V_0$  [25].

*Calcium challenge:*

Mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated in 1.5 ml of buffer B (in mM: 250 sucrose, 10 MOPS, 0.05 EGTA, 10  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2) containing either glutamate-malate (5:2.5 mM) or succinate + rotenone (5 mM, 1  $\mu\text{M}$ ). Changes in extra-mitochondrial calcium concentration were monitored fluorimetrically (Hitachi, F4500 or Ocean Optics SD2000 spectrofluorometer) using Calcium-Green 5N (1  $\mu\text{M}$ , excitation-emission: 505-535 nm) as described by Ichas et al. [26]. Residual calcium concentration was adjusted to the same level at the beginning of every experiment by adding a small amount of EGTA. Calcium pulses (42 nmol/mg protein) were added at 2 min intervals until a  $\text{Ca}^{2+}$ -induced- $\text{Ca}^{2+}$ -release was observed. Calcium retention capacity (CRC) was taken as the total amount of  $\text{Ca}^{2+}$  accumulated by mitochondria prior to the  $\text{Ca}^{2+}$  pulse triggering  $\text{Ca}^{2+}$  release [26]. In parallel experiments, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) was measured under the same experimental conditions. For this purpose, Calcium-Green 5N was replaced by Rhodamine 123 (0.2  $\mu\text{M}$ : excitation-emission, 503-525 nm) and measurements were performed as described by Emaus et al. [27]. Mitochondrial release of Rhodamine 123 following uncoupling with 100 nM carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was taken as an index of membrane potential.

*Enzymatic analyses:*

The measurements of the specific activity of the rotenone-sensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate-ubiquinone reductase (complex II), rotenone-sensitive NADH-cytochrome c oxidoreductase (complex I + III),

cytochrome *c* oxidase (complex IV) and citrate synthase (CS) were performed spectrophotometrically on left ventricular homogenates according to Jarreta et al. [10].

*Isolated heart perfusion:*

Hearts were rapidly excised and immersed in ice-cold Henseleit (KH) buffer (in mM: NaCl 119, KCl 4.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub>, 24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 11, pH 7.4). The aorta was cannulated, and the coronary arteries perfused with KH buffer in the Langendorff mode at a constant pressure of 70 mm Hg. This pressure is recommended for heart perfusion with crystalline buffers in order to limit edema, which occurs when physiological perfusion pressures (90-100 mm Hg) are used [28]. In addition, an incision was made in the pulmonary artery to favor drainage of the coronary effluent. The perfusion solution was oxygenated with 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C throughout the perfusion. Hearts were maintained in a water-jacketed chamber maintained at 37°C and were not paced. Perfusion pressure was monitored by use of an in-line pressure transducer connected to an in-line data acquisition system (Powerlab 8/30, ADInstruments, Colorado Springs, CO). Ventricular pressure was monitored via a separate pressure transducer connected to a fluid-filled latex balloon inserted in the left ventricle via the left atrium. The size of the balloon was adjusted to take into account differences in the size of the left ventricular cavity and was inflated to provide an end-diastolic pressure of ~10 mm Hg. Hearts were submitted to a protocol consisting of 30 min of low-flow ischemia (3% of pre-ischemic flow delivered by means of a roller pump) followed by 40 min of reperfusion. Norepinephrine (100 µM) was infused by means of a syringe pump during the entire I-R protocol starting 5 min prior to ischemia in order to mimic the adrenergic stress encountered during I-R. In addition, norepinephrine induced significant damage and PTP opening and yet allowed to obtain a systematic recovery of measurable contractile function during reperfusion. Coronary effluent was collected at 10-min interval throughout the perfusion for measurements of coronary flow and determination of LDH release. LDH activity in the perfusate was measured

spectrophotometrically on the same day using a method previously described [29], and LDH release was expressed in  $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  of wet tissue.

*Measurement of PTP opening in situ with 2-deoxy [ $^3\text{H}$ ] glucose*

PTP opening *in situ* was assessed using the [ $^3\text{H}$ ] DOG entrapment method developed by Halestrap and colleagues [30-32] with minor modifications. This method relies on the fact that once taken up by cardiac cells through glucose transporters, the non-metabolizable glucose analog [ $^3\text{H}$ ] DOG is trapped in the cytosol as [ $^3\text{H}$ ] DOG-6P. Given the very low permeability of mitochondria to sugars, [ $^3\text{H}$ ] DOG-6P does not normally enter the mitochondria. However, when PTP opening occurs, solutes of less than 1500 Da will equilibrate across mitochondrial membranes thus allowing rapid [ $^3\text{H}$ ] DOG-6P incorporation into mitochondria. The extent to which [ $^3\text{H}$ ] DOG-6P is entrapped within mitochondria is thus used as an indicator of the number of mitochondria that have undergone PTP opening in response to a cardiac insult.

In order to load cardiomyocytes with [ $^3\text{H}$ ] DOG prior to ischemia-reperfusion, hearts were initially perfused for 10 min with regular KH buffer. Following this stabilization period, hearts were perfused for 20 min with KH buffer supplemented with 0.5 mM 2-deoxy [ $^3\text{H}$ ] glucose ( $0.1 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Hearts were then perfused for 5 additional minutes with normal KH in order to wash out extracellular [ $^3\text{H}$ ] DOG and submitted to ischemia-reperfusion as described above or immediately processed for the measurement of baseline mitochondrial [ $^3\text{H}$ ] DOG entrapment.

At the end of perfusion, hearts were removed, weighted and homogenized in 5 ml of ice-cold sucrose buffer (in mM: sucrose 300, Tris-HCl 10, EGTA 2, BSA 5 mg/ml, pH 7.4) with a polytron homogenizer (setting 3 for 5 s) and volume was then completed to 40 ml. An aliquot of the crude homogenate was retained for measurements of [ $^3\text{H}$ ] DOG, and the remainder was immediately centrifuged at 800 x

g for 2 min to remove cellular debris. The supernatant was recovered and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. The mitochondrial pellet obtained was washed in 30 ml of sucrose buffer containing no BSA and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. The final mitochondrial pellet was resuspended in 1.0 ml of sucrose buffer without BSA. 100 and 500  $\mu$ l of this mitochondrial suspension were retained for the measurement of citrate synthase (CS) activity and determination of [ $^3$ H] DOG, respectively, while the remainder was used for respirometry experiments as described above. In all buffers, a high concentration of EGTA was used in order to favor rapid PTP closure and entrapment of [ $^3$ H] DOG [30]. For the measurement of [ $^3$ H] DOG, crude homogenate and mitochondrial samples were mixed with an equal volume of 5% (w/v) perchloric acid and centrifuged at 10 000 x g for 2 min. Radioactivity of the supernatant (500  $\mu$ l samples) was counted in 10 ml of scintillant.

#### *Mitochondrial [ $^3$ H] DOG entrapment*

Calculation of the DOG index was performed as described by Griffiths and Halestrap [30]. This index, which reflects the number of mitochondria in which PTP opening occurred over the perfusion protocol, was expressed as follows:

$$\text{DOG index} = 10^5 \times \text{mitochondrial } [^3\text{H}] \text{ DOG} / \text{tissue } [^3\text{H}] \text{ DOG}.$$

where mitochondrial and tissue [ $^3$ H] DOG are expressed in dpm per unit of CS and dpm per g of wet ventricular tissue respectively. This calculation thus allows mitochondrial [ $^3$ H] DOG entrapment to be normalized for the concentration of mitochondria present in the mitochondrial fraction and for possible differences in the tissue uptake of the tracer [30].

#### *Statistical analyses:*

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical differences in morphometric and biochemical parameters were analyzed by means of two-tailed Student's *t*-tests. For myocardial function, pre-ischemic and post-ischemic values

were analyzed by means of ANOVA for repeated measures. When multiple comparisons were made, differences were analyzed using one-way ANOVA and Bonferonni post hoc tests were performed to identify the location of significant differences. A corrected  $p$  value  $<0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### *Effect of ACF on morphological parameters and mitochondrial yield:*

As shown in Table 1, 12 weeks of volume overload induced an important biventricular hypertrophy expressed both in absolute values and relative to tibial length, consistent with results previously obtained using this model [22, 33]. Lung weight was significantly higher in ACF vs sham ( $p < 0.01$ ), but no difference was observed in the liver weight, no animal displayed ascites and no lethality was observed over the course of the study.

### *Respiratory chain enzymology, baseline respiratory function and membrane potential:*

Table 2 shows the results of enzymatic analyses performed on left ventricular homogenates of sham and ACF animals. No significant differences were observed between both experimental groups for the activities of the respiratory chain complex I, II, I+III, and IV as well as citrate synthase. Figure 1 shows the results of mitochondrial respiratory function in the presence of the complex I substrates glutamate-malate under baseline conditions. Basal ADP-restricted ( $V_0$ ) and maximal ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) respiration were similar in mitochondria from sham and ACF animals, and RCR values of  $\sim 6$  were observed in both experimental groups. Steady state  $\Delta\Psi$  under non-phosphorylating conditions was also similar in the two experimental groups ( $419 \pm 63$  and  $358 \pm 39$  AFU in sham and ACF respectively,  $n = 9-10$ ,  $P = \text{NS}$ ). These data indicate that under unstressed conditions there was no apparent alteration in tissue oxidative capacity, respiratory function, membrane potential and coupling between oxidation and phosphorylation in mitochondria from ACF animals.

### *Response to anoxia-reoxygenation in vitro:*

Figure 2 shows the results of experiments in which mitochondria were submitted to *in vitro* anoxia-reoxygenation. In mitochondria from sham animals,  $V_{ADP}$  measured at 10 and 20 min of reoxygenation was respectively decreased to  $64 \pm 4\%$



and  $54 \pm 4\%$  of baseline values measured in the absence of stress (Figure 2 B). This inhibition of maximal ADP-stimulated respiration was accompanied by a significant reduction in RCR values (Figure 2C). In contrast, the same treatment induced significantly more damage in mitochondria from ACF animals. Indeed,  $V_{ADP}$  was reduced to  $51 \pm 3$  and  $30 \pm 3\%$  of baseline value at 10 and 20 min of reoxygenation, respectively, and RCR values were significantly lower compared to that observed in mitochondria from sham animals.

Opening of the permeability transition pore (PTP) is known to contribute to mitochondrial disruption in response to conditions encountered following ischemia-reperfusion [14, 30]. In order to investigate whether a greater occurrence of PTP opening could underlie the increased vulnerability of ACF mitochondria, anoxia-reoxygenation experiments were repeated in the presence of the PTP inhibitor CsA (Figure 2). In mitochondria from sham animals, CsA induced slight but significant increases in the values of  $V_{ADP}$  and RCR, although it did not restore them fully to baseline levels. In contrast, CsA improved  $V_{ADP}$  and RCR at 10 and 20 min of reoxygenation to a greater extent in mitochondria from ACF animals, therefore abolishing the difference in  $V_{ADP}$  and RCR observed between sham and ACF animals following anoxia-reoxygenation.

In mitochondria energized with complex I substrates, opening of the PTP leads to transient respiratory uncoupling due to the abrupt loss of proton motive force. However, because pyridine nucleotides are readily released from mitochondria through open pores [34, 35], respiratory inhibition rapidly follows [35]. As shown in Figure 3, addition of exogenous NADH to energized mitochondria had no significant effect under baseline conditions in absence of anoxia-reoxygenation. In sham animals, anoxia-reoxygenation caused a small effect on NADH-stimulated respiration, which was not significantly different from that observed at baseline in the absence of stress. In contrast, NADH significantly increased respiration in ACF

animals and the presence of CsA reduced the stimulating effect of NADH to a level that was not significantly different from sham animals.

*Susceptibility to Ca<sup>2+</sup>-induced PTP opening:*

To confirm the greater vulnerability to PTP opening in ACF animals, mitochondria were submitted to progressive Ca<sup>2+</sup> loading, as accumulation of Ca<sup>2+</sup> in the matrix is the obligatory trigger for PTP opening [36]. Figure 4 shows the typical response of mitochondria energized with the complex I donors glutamate + malate to a series of Ca<sup>2+</sup> pulses. In both experimental groups, a small and transitory decline in  $\Delta\Psi$  was observed following each Ca<sup>2+</sup> pulse as a result of the electrophoretic uptake of Ca<sup>2+</sup>. Mitochondria from sham animals were able to accumulate  $143 \pm 11$  nmol Ca<sup>2+</sup>/mg protein before an abrupt loss of  $\Delta\Psi$  and release of accumulated Ca<sup>2+</sup> was observed. This was invariably accompanied by mitochondrial swelling caused by equilibration of solutes across mitochondrial membranes, confirming that PTP opening was responsible for these effects (data not shown). In contrast, in mitochondria from ACF animals, the amount of Ca<sup>2+</sup> required to trigger these effects was  $41.1 \pm 5.8$  % lower ( $p < 0.01$ ).

We [24] and others [35] have shown that the regulation of PTP opening depends on the type of respiratory substrate that is oxidized, with complex I donors acting as sensitizers compared to complex II donors. Therefore, Ca<sup>2+</sup> challenge experiments were repeated in the presence the complex II substrate succinate (in the presence of the complex I blocker rotenone) (Figure 4). In accordance with previous results, CRC in the presence of succinate was significantly higher (~2 fold) compared to that observed in the presence of the complex I substrates glutamate-malate in both experimental groups. However, CRC remained significantly lower in mitochondria from ACF ( $177 \pm 12$  nmol/mg) compared to sham ( $273 \pm 19$  nmol/mg).

*Response to ischemia-reperfusion:*

In order to determine whether this mitochondrial vulnerability to stress also occurred in the whole organ and was associated with greater dysfunction and injury, isolated hearts were submitted to ischemia-reperfusion in the presence of adrenergic stress and pore opening was assessed *in situ* using the mitochondrial entrapment of [<sup>3</sup>H] DOG. Figure 5 shows the evolution of heart rate, left ventricular developed pressure, diastolic pressure and coronary flow throughout the perfusion protocol. Prior to ischemia, no significant difference was observed between the two experimental groups in any contractile parameters. However, during reperfusion following 30 min of severe low-flow ischemia, the recovery of contractile function was significantly impaired in hearts from ACF animals as indicated by lower values of LVDP, a significantly greater rise in diastolic pressure and altered rates of force development and relaxation (data not shown). In contrast, coronary flow per gram of tissue was similar in both experimental groups during reperfusion indicating that the impairment of functional recovery in ACF hearts was not related to a lower coronary flow. The release of LDH in the coronary effluent was low and similar in both experimental groups prior to ischemia ( $35 \pm 7$  mU.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> wet weight, pooled average  $n=17$ ). However, the amount of LDH released over the reperfusion period was 2-fold higher in hearts from ACF animals, (Figure 6A), indicating an exacerbated loss of sarcolemmal integrity compared to sham.

It was previously shown that in healthy hearts that are not submitted to I-R, [<sup>3</sup>H] DOG incorporation in mitochondria is low and probably represents a combination of a slow PTP-independent uptake of [<sup>3</sup>H] DOG into mitochondria and contaminant vesicular components in the mitochondrial fraction [30, 37]. Consistent with these results, the mitochondrial DOG index was low in non-ischemic hearts (Figure 6B) and no significant differences were observed between the two experimental groups ( $21 \pm 1.6$  and  $21 \pm 0.9$  DOG ratio units in sham and ACF respectively). In hearts from sham animals, I-R increased the DOG index 3.5-fold above baseline pre-ischemic values reaching  $69 \pm 7$  DOG ratio units. However, in

hearts from ACF animals, the DOG index reached a value that was 55% higher than in sham hearts ( $107 \pm 6$  DOG ratio units), indicating that the number of mitochondria that had undergone permeability transition following whole-organ ischemia-reperfusion was greater in ACF animals (Figure 6 B). In addition, in mitochondria isolated from the hearts after reperfusion, *in vitro* values of maximal ADP-stimulated respiration (Figure 6 C) and RCR ( $5.1 \pm 0.5$  and  $3.8 \pm 0.3$  in sham and ACF respectively,  $p < 0.05$ ) in the presence of glutamate-malate were significantly lower in ACF compared to sham. Altogether, the differences in mitochondrial performance after ischemia-reperfusion in perfused hearts were therefore in good agreement with the results we have obtained following anoxia-reoxygenation *in vitro*.

## DISCUSSION

Although mitochondrial dysfunction has often been associated with heart failure, it has been suggested that it may represent only a late phenomenon in the disease process. In the present study we show that, following 12 weeks of chronic volume overload induced by an ACF, tissue oxidative capacity and mitochondrial function under stress-free optimal conditions were normal yet mitochondria displayed a marked vulnerability to injury in response to stress, as indicated by a greater impairment of oxidative phosphorylation following anoxia-reoxygenation and by an enhanced sensitivity to PTP opening *in vitro*. Importantly, these results are not likely to result from *in vitro* artefacts because similar phenomena also occurred *in situ* when hearts from ACF animals were submitted to whole-organ ischemia-reperfusion, and this was accompanied by a poorer recovery of contractile function and enhanced tissue injury.

### *Tissue oxidative capacity and baseline mitochondrial function:*

There are several reports in the literature concerning the impact of pathological cardiac remodeling on mitochondrial function and in particular on their capacity for ATP production. A reduction in the activity of mitochondrial enzymes, specific defects in respiratory chain complexes I through IV, as well as an impairment of respiratory function in isolated mitochondria has consistently been reported in animal models of cardiac failure and in end-stage human failing hearts [6-11]. In contrast, chronic compensated hypertrophy without systolic dysfunction has been typically associated in animals and humans with either normal or even improved mitochondrial function [38-43]. Accordingly, it has been suggested that impairments in mitochondrial capacity for energy production represent a late phenomenon that occurs once the failing stage has been reached [12, 44].

The results reported in the present study are consistent with these observations since the activities of the respiratory chain complexes I, II, I+III, and IV were similar

in LV tissue from sham and ACF animals (Table 2). Moreover, characterization of mitochondrial function under baseline unstressed conditions indicated no change in ADP-restricted and maximal ADP-stimulated respiration, membrane potential as well as the coupling of oxidation to phosphorylation (Figure 1).

*Mitochondrial vulnerability to anoxia-reoxygenation in vitro:*

Despite the fact that all measured variables of mitochondria appeared normal under basal conditions,  $V_{ADP}$  and RCR values were significantly more reduced in mitochondria from ACF compared to sham animals following anoxia-reoxygenation. It should be noted that, in preliminary experiments, we did not find evidence for increased vulnerability of mitochondria to anoxia-reoxygenation at 4 and 8 weeks following induction of the ACF (results not shown), suggesting that cardiomyocytes have to be subjected to several weeks of overload before one can detect the decreased tolerance of mitochondria to stress.

It is widely recognized that one of the factors responsible for mitochondrial disruption in response to conditions encountered following ischemia-reperfusion is the opening of the permeability transition pore (PTP) [14, 30]. The PTP is a high conductance non-specific pore formed by a supramolecular complex spanning the double membrane system of the mitochondria mainly at contact sites. Opening of the PTP induces the loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), uncoupling of oxidative phosphorylation, high amplitude swelling of the matrix and the release of several pro-apoptotic factors that are normally sequestered in mitochondria including cytochrome *c*, AIF, Smac/Diablo, endonuclease G, Omi-HtrA2, and some procaspases [16, 45].

In the present study, we observed that during anoxia-reoxygenation the presence of the PTP inhibitor CsA abolished the difference in  $V_{ADP}$  and RCR observed between mitochondria from sham and ACF animals at 10 and 20 min of reoxygenation (Figure 2). In addition, supplementation of exogenous NADH to

compensate for the loss of endogenous pyridine nucleotides that occurs following PTP opening [35] significantly increased respiration only in ACF animals and this was abolished by CsA (Figure 3). Altogether, these data suggest that the occurrence of pore opening was an important factor responsible for the greater respiratory dysfunction observed in mitochondria from ACF compared to sham animals in response to anoxia-reoxygenation.

It is noticeable that under the conditions used in these experiments PTP opening did not appear to be an important factor responsible for respiratory dysfunction in sham animals as CsA had only a limited effect on respiration. Other factors such as oxidative damage to cardiolipin and proteins including respiratory chain complexes could be mainly responsible for the respiratory dysfunction observed in this group following anoxia-reoxygenation (reviewed in [46]). While the same mechanism probably affected mitochondria from ACF animals, the fact that CsA restored respiration to the level observed in sham indicated that PTP opening was responsible for the difference between the sham and ACF groups irrespective of other mechanisms causing dysfunction.

*Susceptibility to  $Ca^{2+}$ -induced PTP opening:*

Ozcan et al. [8] reported that, in mitochondria obtained from the failing hearts of TNF $\alpha$  transgenic mice and energized with substrates for complex I, the sensitivity to PTP opening in response to  $Ca^{2+}$  was increased by ~40%. In the present study, the ~50% reduction in the amount of  $Ca^{2+}$  required to trigger pore opening in mitochondria from ACF animals in the presence of glutamate-malate confirms and extends these data by showing that an increased vulnerability to PTP opening can be observed in mitochondria from non-failing hearts in the absence of any apparent mitochondrial dysfunction at baseline under stress-free conditions. This observation is also compatible with our data showing that pore opening appeared to explain the difference in respiratory function following anoxia-reoxygenation. Of note,  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition is known to be modulated by a variety of

physiological effectors (see [36] for review), including the flow of electrons through complex I, which increases the sensitivity of PTP to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced opening [24, 35]. However, in the present study, bypassing complex I using succinate did not abolish the difference in CRC between both experimental groups, suggesting that the greater sensitivity of ACF mitochondria to pore opening was not related to a mechanism involving electron flow through complex I.

*Response to ischemia-reperfusion:*

A recent study by Javadov et al. [25] has shown that the mitochondrial entrapment of [ $^3\text{H}$ ] DOG was significantly increased 18 weeks after myocardial infarction. However, this was observed under well-perfused conditions in the absence of external stress, which contrasts with our results showing no difference in mitochondrial [ $^3\text{H}$ ] DOG entrapment between sham and ACF animals under baseline normoxic conditions. This discrepancy probably reflects the fact that 18 weeks post-infarction hearts were well into the failure process and displayed clear impairment in tissue oxidative capacity and mitochondrial function at baseline [25], while in our experiments hearts were studied at a much less severe stage in the absence of major mitochondrial and contractile dysfunction either *in vivo* [22] or *ex vivo* under normal perfusion conditions (Figure 5). This would be consistent with the fact that in the study by Javadov et al. [25] no change in baseline mitochondrial [ $^3\text{H}$ ] DOG entrapment was observed 8 and 12 weeks post-infarction at a time when mitochondrial function was normal and no signs of decompensation were apparent.

Our study moreover reveals that mitochondrial [ $^3\text{H}$ ] DOG entrapment was substantially greater in hearts from ACF compared to sham animals following ischemia-reperfusion. Additionally, in line with the results obtained in our *in vitro* experiments, mitochondria from ACF animals isolated following reperfusion displayed lower values of  $V_{\text{ADP}}$  and RCR compared to sham. Our results thus indicate that, prior to the overt mitochondrial defects inherent to failure, mitochondria clearly show an increased vulnerability to PTP opening and dysfunction when the heart is



submitted to stress. Given that the extent of pore opening was previously found to have a significant impact of myocardial recovery during reperfusion [34, 47], this could at least partly account for the poorer recovery of contractile function and the greater release of LDH during reperfusion in hearts from ACF animals.

## CONCLUSION

Taken together, our study provides the first example that, in hearts undergoing adverse ventricular remodeling, increased vulnerability of mitochondria to PTP opening and dysfunction can occur prior to the development of systolic dysfunction, whereas the mitochondria display no impairment under baseline unstressed conditions. This was observed both in isolated mitochondria exposed to anoxia-reoxygenation *in vitro* and in mitochondria *in situ* in hearts undergoing whole-organ ischemia-reperfusion injury. The importance of these results may relate to the fact that, during normal progression of overload cardiomyopathy, mitochondria within cardiomyocytes are likely to encounter conditions that favor PTP opening such as oxidative stress [48-50], increased diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels [51, 52] and hypoxia and/or ischemia [8, 49]. Failure of some mitochondria to handle these stresses could thus be an important event initiating a vicious circle of increased mitochondrial damage that eventually leads the hypertrophied heart into decompensation.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grant MOP-62694 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). YB is a Junior Investigator of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MM is supported by a Ph.D. scholarship from FRSQ. The work of CFD is supported by CIHR grants MOP-64391 and MOP-74460.

**REFERENCES**

- [1] Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H8-16.
- [2] Katz AM. Maladaptive growth in the failing heart: The cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:245-9.
- [3] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45-79.
- [4] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *N Engl J Med* 1990;322:1561-6.
- [5] Benjamin EJ, Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci* 1999;317:168-75.
- [6] Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 2001;104:2492-2497.
- [7] Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2000;32:2361.
- [8] Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL, Terzic A. Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1161-6.
- [9] Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:1333-47.
- [10] Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2000;45:860-5.

- [11] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001;88:529-35.
- [12] van Bilsen M, Smeets PJH, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: The cardiac burn-out syndrome? *Cardiovascular Research* 2004;61:218.
- [13] Sabbah HN, Sharov VG, Goldstein S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Failure Reviews* 2000;5:131.
- [14] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233-49.
- [15] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin d reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658.
- [16] Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000;28:170-7.
- [17] Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin d-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652-8.
- [18] Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, et al. Cyclophilin d is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *PNAS* 2005;102:12005-12010.
- [19] Holmes JW. Candidate mechanical stimuli for hypertrophy during volume overload. *J Appl Physiol* 2004;97:1453-60.
- [20] Ashikaga H, Covell JW, Omens JH. Diastolic dysfunction in volume-overload hypertrophy is associated with abnormal shearing of myolaminar sheets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2603-2610.
- [21] Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H674-83.

- [22] Souzeau E, Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension* 2006;47:128-133.
- [23] Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res* 1990;24:430-2.
- [24] Marcil M, Bourduas K, Ascah A, Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1549-1557.
- [25] Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M. Nhe-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:135-43.
- [26] Ichas F, Jouaville, L.S., Mazat, J.P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 1997;89:1145-1153.
- [27] Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: Spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 1986;850:436-48.
- [28] Döring HJ, Dehnert, H. The isolated perfused heart. West Germany: Biomesstechnik-Verlag; 1988.
- [29] Burelle Y, Hochachka PW. Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers. *J Appl Physiol* 2002;92:2429-38.
- [30] Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995;307:93-8.
- [31] 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.
- [32] 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.

- [33] Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J Appl Physiol* 2003;94:752-763.
- [34] Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic nad<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 2001;276:2571-5.
- [35] 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.
- [36] Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995;1241:139-76.
- [37] Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin a binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997;174:167-72.
- [38] Dart CH, Jr., Holloszy JO. Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization. *Circ Res* 1969;25:245-53.
- [39] Lindenmayer GE, Sordahl LA, Schwartz A. Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. *Circ Res* 1968;23:439-50.
- [40] Sobel BE, Spann JF, Jr., Pool PE, Sonnenblick EH, Braunwald E. Normal oxidative phosphorylation in mitochondria from the failing heart. *Circ Res* 1967;21:355-364.
- [41] Sordahl LA, McCollum WB, Wood WG, Schwartz A. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am J Physiol* 1973;224:497-502.

- [42] Stoner CD, Ressallat MM, Sirak HD. Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts. *Circ Res* 1968;23:87-97.
- [43] Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Chandwaney R, Parmelee DJ, Ji LL. Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart. *Acta Physiol Scand* 1996;156:51-60.
- [44] Swynghedauw B, Delcayre C. Biology of cardiac overload. *Pathobiol Annu* 1982;12:137-83.
- [45] Batandier C, Leverve X, Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex i. *J Biol Chem* 2004;279:17197-204.
- [46] Lesnefsky EJ, Gudzi TI, Moghaddas S, Migita CT, Ikeda-Saito M, Turkaly PJ, et al. Aging decreases electron transport complex iii activity in heart inter-fibrillar mitochondria by alteration of the cytochrome c binding site. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:37-47.
- [47] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372-85.
- [48] Li J-M, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of nadph oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002;40:477-484.
- [49] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:500-8.
- [50] Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999;98:555-8.
- [51] Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular  $ca^{2+}$  handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:556-64.
- [52] Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:290-9.



## FIGURE LEGENDS

### Figure 1: Effect of ACF on baseline mitochondrial respiration

Basal ( $V_0$ ), ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) and respiratory control ratio (RCR:  $V_{ADP}/V_0$ ) of mitochondria energized with glutamate-malate (5:2.5 mM). Values are reported as mean values  $\pm$  SEM for  $n = 12$  in each group.

### Figure 2: Effect of ACF on susceptibility to anoxia-reoxygenation injury

Panel A shows a typical recording of oxygen concentration during anoxia-reoxygenation in mitochondria from sham and ACF animals. Values of ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) respiration and RCR measured at baseline and after 10 and 20 min of reoxygenation are shown in panels B and C. Experiments were performed in the absence or presence of 1  $\mu$ M cyclosporin A (CsA) added before anoxia. Values are reported as mean values  $\pm$  SEM for  $n = 12$  in each group. §: Significantly different from pre-anoxia within the same experimental group,  $p < 0.01$ , \*: significantly different from sham in the same experimental condition  $p < 0.01$ .

### Figure 3: Effect of NADH on respiration in mitochondria from sham and ACF animals at 20 min of reoxygenation following anoxia.

Panel A shows the slopes of original respirometry tracings after subsequent addition of mitochondria ( $V_0$ ), 1 mM ADP ( $V_{ADP}$ ) and 4 mM NADH ( $V_{NADH}$ ) in mitochondria from sham and ACF animals at baseline in the absence of anoxia-reoxygenation (line a and c) and after 20 min of reoxygenation in the absence of 1  $\mu$ M cyclosporin A (CsA) (line b and d). Typical tracing obtained in ACF animals following reoxygenation in the presence of CsA is also shown (line e). Panel B represents the average effect of NADH supplementation on respiration in both experimental groups (mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$  separate preparations) at baseline in the absence of stress and following 20 min or reoxygenation in the absence or presence of (CsA). In mitochondria from ACF animals, anoxia-reoxygenation resulted in a more

pronounced reduction in the stimulatory effect of ADP on respiration compared to sham (A, line d vs line b). In mitochondria from sham animals, addition of NADH to mitochondria had only small effects on respiration in all experimental conditions (B). In contrast, in mitochondria from ACF animals, addition of NADH resulted in a significant increase in respiration following anoxia-reoxygenation, and this effect was abolished in the presence of CsA (B). In addition, in the ACF group, the presence of CsA allowed to increase  $V_{ADP}$  to the level observed in the sham group (A line e vs line b). §: Significantly different from -CsA within the same experimental group,  $p < 0.05$ , \* significantly different from sham,  $p < 0.05$ .

**Figure 4: Effect of ACF on the sensitivity to  $Ca^{2+}$ -induced PTP opening.** Typical  $Ca^{2+}$  kinetics (A, C, E and G) and membrane potential (B, D, F and H) tracings of sham and ACF mitochondria energized with glutamate-malate (5:2.5 mM) (A-D) or succinate (5 mM) in the presence of 1  $\mu$ M rotenone (E-H). Tracings show progressive  $Ca^{2+}$  accumulation followed by release of accumulated  $Ca^{2+}$  and collapse of membrane potential. Each arrow indicates the addition of a calcium pulse of 42 nmol/mg of protein. Panel I shows mean values for  $Ca^{2+}$  retention capacity (CRC) computed from 8 to 10 independent preparations. \*: Significantly different from sham,  $p < 0.05$ .

**Figure 5: Myocardial response to ischemia-reperfusion in sham and ACF animals.** The figure shows the evolution of heart rate, left ventricular developed pressure (LVDP), diastolic pressure and coronary flow in sham and ACF hearts submitted to low flow ischemia in the presence of adrenergic stress. For sake of clarity, the values obtained in hearts that were not submitted to I-R ( $n = 4$  in each group) and were used for measurements of baseline [ $^3$ H] DOG are not shown. Following the initial 10-min period of stabilization, hearts were perfused with KH buffer containing [ $^3$ H] DOG as indicated. Perfusion was switched back to normal KH buffer for 5 min prior to ischemia in order to wash out extracellular [ $^3$ H] DOG. During washout, the infusion of norepinephrine (100  $\mu$ M) was started and maintained

during I-R. LVDP was calculated as the difference between systolic and diastolic pressure. \*: Significantly different from sham,  $p < 0.05$ .

**Figure 6: LDH release, mitochondrial [<sup>3</sup>H] DOG entrapment and respiratory function post-reperfusion in sham and ACF animals.** Panel A shows the area under the curve of LDH release in the perfusate during reperfusion. LDH release was calculated by multiplying time-matched values of coronary flow (in  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight) and LDH concentration measured in the perfusate (in  $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight). Panel B shows the [<sup>3</sup>H] DOG index expressed as the ratio mitochondrial dpm/tissue dpm. (see Methods for further details) in non-ischemic hearts (NI:  $n = 4$  in each group) and hearts submitted to I-R (IR:  $n = 9$  and  $8$  for sham and ACF respectively). Panel C shows values obtained for basal ADP-restricted ( $V_0$ ) and maximal ADP stimulated ( $V_{\text{ADP}}$ ) respiration measured in mitochondria isolated at the end of reperfusion.

**Table 1: Morphometric data and mitochondrial isolation yield in sham and ACF rats.**

|  | Sham        | ACF                      |
|--|-------------|--------------------------|
| Body weight (g)  | 362 ± 12    | 410 ± 15 <sup>#</sup>    |
| Heart weight (mg)                                      | 1348 ± 39   | 2172 ± 85 *              |
| LV weight (mg)   | 913 ± 37    | 1377 ± 39 *              |
| RV weight (mg)   | 308 ± 16    | 429 ± 34 *               |
| Lung weight (mg)                                       | 1312 ± 70   | 1748 ± 89 <sup>#</sup>   |
| Liver weight (g)                                       | 11.9 ± 0.4  | 12.3 ± 0.9               |
| Tibial length (mm)                                     | 395 ± 7     | 393 ± 3                  |
| Heart weight / Tibial length (mg/mm)                   | 3.4 ± 0.1   | 5.4 ± 0.2 *              |
| LV weight / Tibial length (mg/mm)                      | 2.3 ± 0.1   | 3.5 ± 0.1 *              |
| RV weight / Tibial length (mg/mm)                      | 0.76 ± 0.05 | 1.03 ± 0.08 <sup>#</sup> |
| Mitochondrial isolation yield (mg protein/g ventricle) | 15.6 ± 1.6  | 16.0 ± 0.9               |

Values are means ± SEM for 12 animals in each group. \* Significantly different from sham ( $p < 0.01$ ).<sup>#</sup> Significantly different from sham ( $p < 0.05$ ).

**Table 2: Activity of mitochondrial enzymes in sham and ACF rats**

|  | Sham<br>(mU/mg protein) | ACF<br>(mU/mg protein) |
|--|-------------------------|------------------------|
| NADH-ubiquinone oxidoreductase<br>(complex I)                          | 0.63 ± 0.07             | 0.53 ± 0.05            |
| Succinate-ubiquinone reductase<br>(complex II)                         | 0.34 ± 0.04             | 0.30 ± 0.03            |
| Cytochrome c oxidase (complex IV)                                      | 1.99 ± 0.12             | 2.15 ± 0.14            |
| Rotenone-sensitive NADH-cytochrome<br>c oxidoreductase (complex I+III) | 0.19 ± 0.01             | 0.18 ± 0.02            |
| Citrate synthase   | 0.78 ± 0.03             | 0.76 ± 0.04            |

Values are means ± SEM for 6 animals in each group.

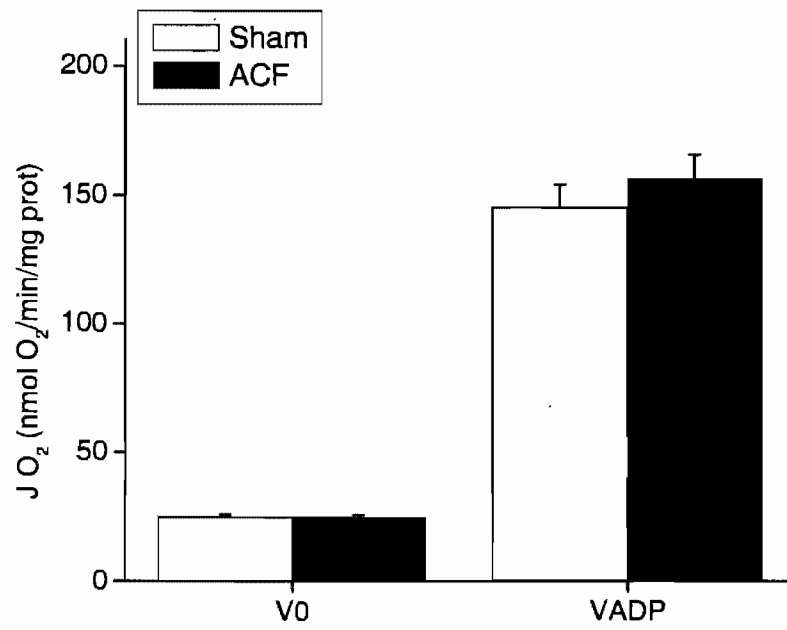


Figure 1

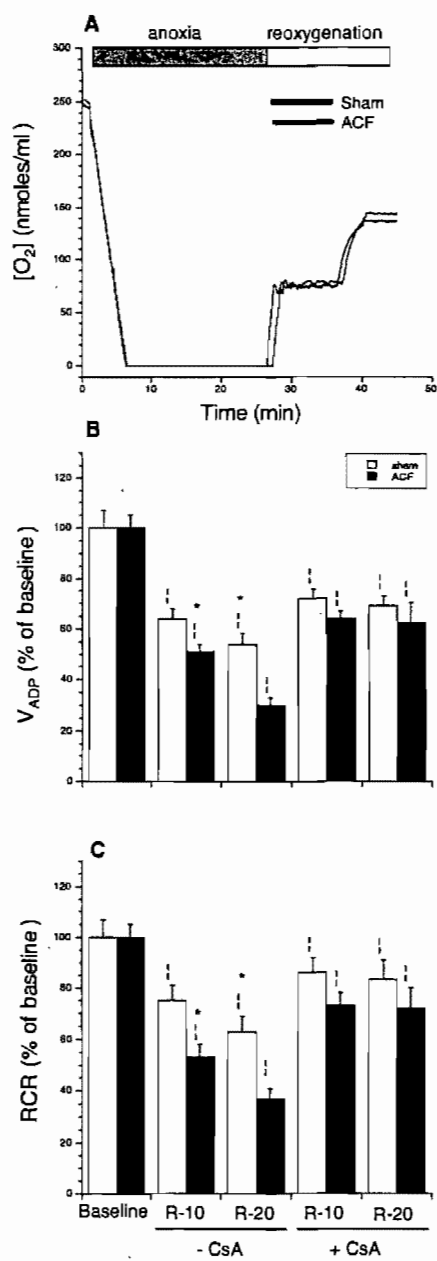


Figure 2

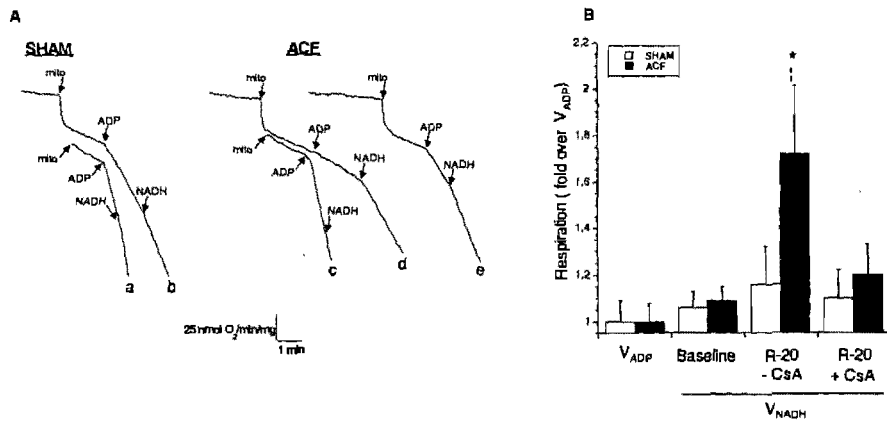


Figure 3



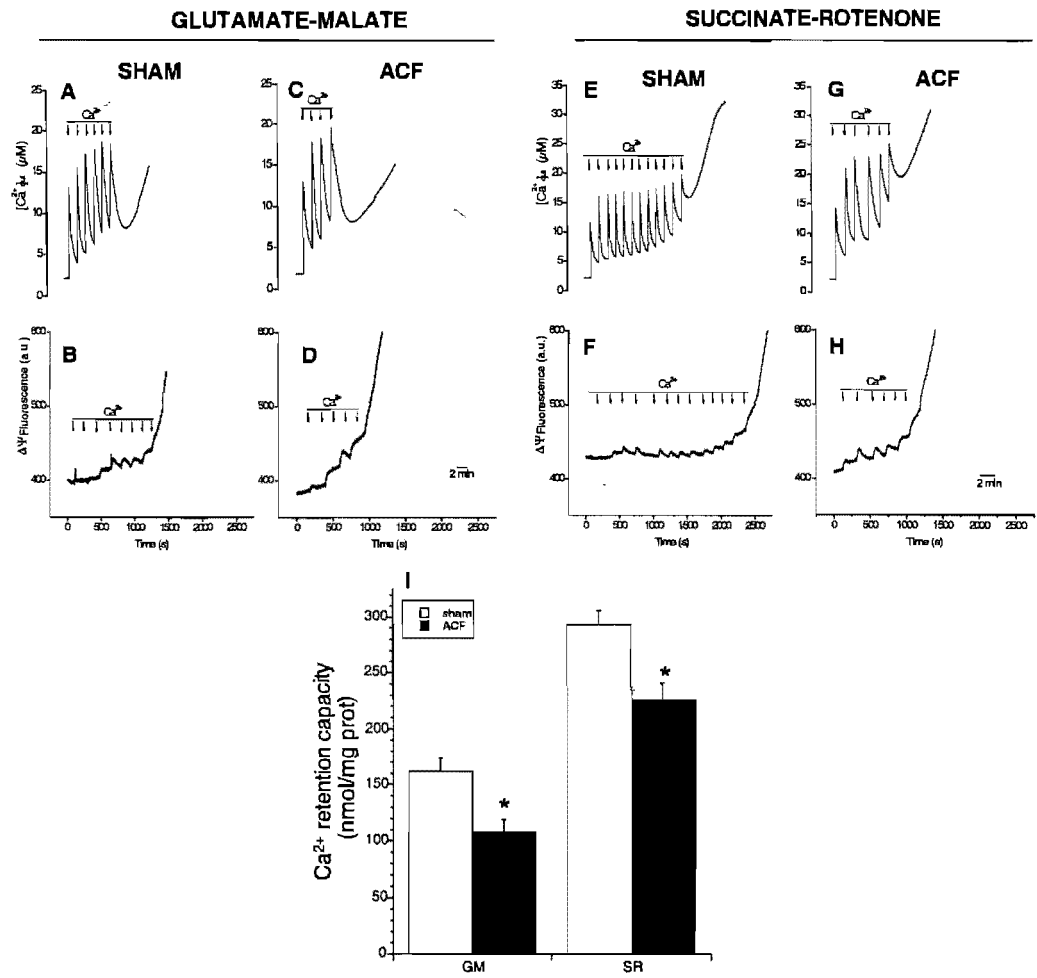


Figure 4

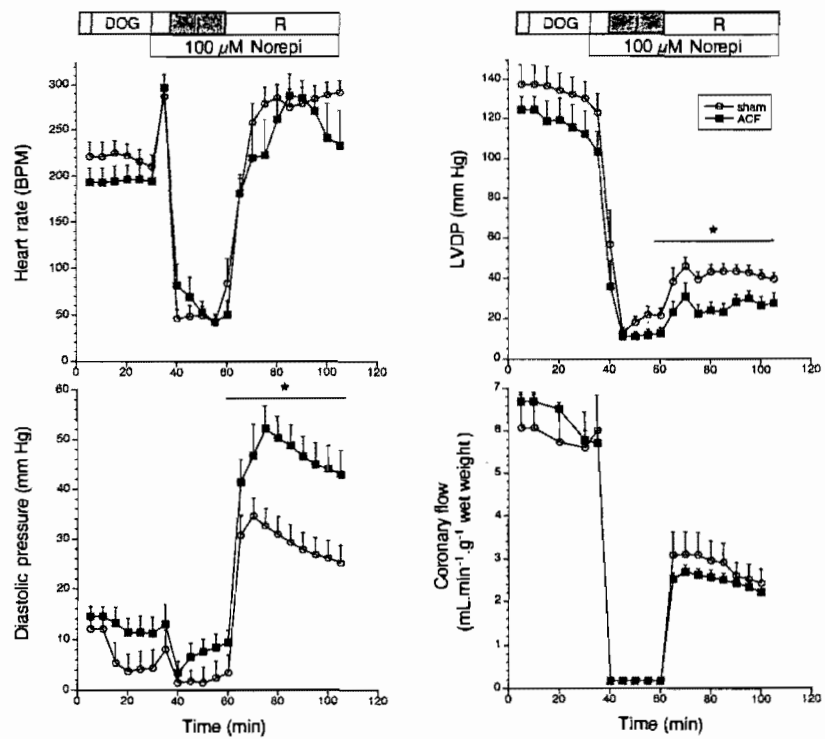


Figure 5

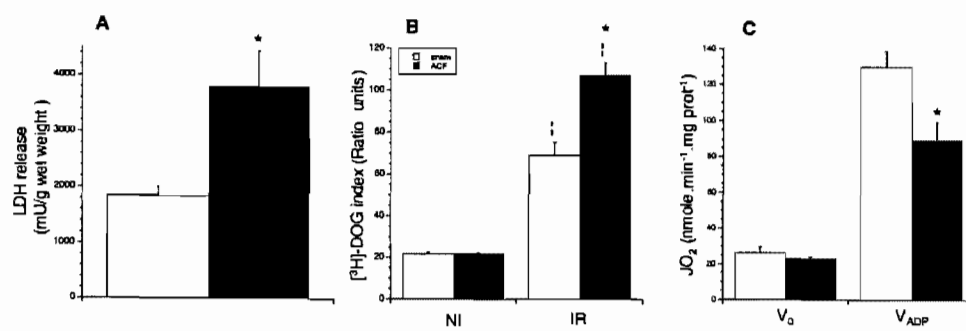


Figure 6

### **2.3. Article 3**

#### **Titre**

Strain-dependency in the progression of ventricular remodeling following volume overload.

#### **Auteurs**

Mariannick Marcil, Alexis Ascah, Jimmy Matas, Sonia Bélanger, Christian F. Deschepper et Yan Burelle

#### **Journal**

En préparation pour *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*

**STRAIN-DEPENDENCY IN THE PROGRESSION OF VENTRICULAR REMODELING  
FOLLOWING VOLUME OVERLOAD.**

Mariannick Marcil<sup>1</sup>, Alexis Ascah<sup>1</sup>, Jimmy Matas<sup>1</sup>, Sonia Bélanger<sup>2</sup>, Christian F. Deschepper<sup>2</sup> and Yan Burelle<sup>1</sup>

1 Département de kinésiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

2 Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Running head: mitochondrial vulnerability in cardiac overload

Send correspondence to:

Yan Burelle, Ph.D

Université de Montréal


Dept. of kinesiology

P.O. Box 6128 Centre-Ville

Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7

Phone : 514-343-6083

Fax : 514-343-2181

E-mail : 

**ABSTRACT**

Despite the known association between left ventricular hypertrophy (LVH) and heart failure, the mechanisms involved in the transition from compensated hypertrophy to decompensated cardiac failure remain poorly understood. The purpose of this study was to compare two genetically different strains of rats (SD and WKHA) submitted to overload-induced ventricular remodeling to examine factors that predispose to the progression toward heart failure. We hypothesized that differences in mitochondrial vulnerability to stress could explain in part strain dependence in predisposition. Hypertrophic remodeling was induced by means of an aorto-caval fistula (ACF) in SD and WKHA rats and the temporal response of ventricular and mitochondrial function as well as the vulnerability to permeability transition pore opening *in situ* in hearts submitted to ischemia-reperfusion and *in vitro* in isolated mitochondria were assessed. The incidence of mortality due to congestive heart failure in response to ACF was higher in SD compared to WKHA rats. Furthermore, the hypertrophic remodeling was greater and contractile dysfunction in ACF hearts during reperfusion appeared earlier (4 weeks post-surgery) in SD compared to WKHA rats suggesting a greater susceptibility to acute stress. In both strains, ACF animals displayed normal baseline contractile and mitochondrial function but were more vulnerable than their sham counterparts to anoxia-reoxygenation injury *in vitro* and to ischemia-reperfusion *in situ* as indicated by a greater impairment in ADP-stimulated respiration and lower LVDP and RPP values, respectively. However, even if the vulnerability to PTP opening and mitochondrial dysfunction was higher in ACF animals, no inter-strain difference was observed suggesting that the mitochondrial vulnerability to stress is not the main factor responsible for the greater predisposition of SD animals to progress toward heart failure.

**Keywords:** volume overload, decompensation, ischemia-reperfusion, mitochondria, vulnerability to stress.

## INTRODUCTION

Despite the known association between left ventricular hypertrophy (LVH) and heart failure, the mechanisms involved in the transition from compensated hypertrophy to decompensated cardiac failure remain poorly understood [1, 2]. Among other factors, the potential role of alterations in energy metabolism, particularly at the level of mitochondria has been increasingly suggested, since several studies reported that systolic heart failure is accompanied by deleterious changes in mitochondrial ultrastructure and function [3-8]. Mitochondrial dysfunction has also been strongly linked to apoptotic and necrotic cell death via an increase in the permeability of their membranes, which collapses the proton motive force and allows the release of several proapoptotic factors normally sequestered in the inter-membrane space [9-11]. This latter phenomenon is important as an excessive loss of cardiomyocytes is currently viewed as a significant contributor to cardiac decompensation [12, 13]. In this regard, our laboratory has recently shown that a mitochondrial vulnerability to stress-induced opening of the permeability transition pore (PTP) (a key mechanism of membrane permeation) develops in the heart of WKHA rats when submitted to volume overload by means of an aorto-caval fistula (ACF) and may constitute an early contributor to the development of overt mitochondrial defects and activation of cell death typically observed later during the disease once the heart reaches the failing stage [14].

The ACF maneuver has been used in the past to induce chronic volume overload in Sprague Dawley (SD) rats [15, 16]. These studies have shown that following the ACF maneuver SD rats develop eccentric cardiac remodeling, and rapidly progress toward decompensated cardiac failure, with mortality rates of 50 and 80% at 12 and 24 weeks post-surgery [15, 16]. Interestingly, these observations are in sharp contrast with previous results from our laboratory obtained in WKHA rats [14, 17]. Indeed, in this strain, the ACF maneuver appears to be much better tolerated as animals develop substantial ventricular remodeling but rarely progress toward heart failure before 35 weeks (unpublished observations). Although direct comparison of

these two strains has not been performed, these results suggest that genetically specified characteristics can predispose the heart to progress toward heart failure when confronted to a given hypertrophic stimulus. With the long-term objective of identifying these genetic factors, the present study aimed to confirm whether difference in susceptibility to progress toward heart failure exist between the SD and WKHA strains, which would make these two strains a good working model. For this purpose the effect of the ACF maneuver on survival, myocardial remodeling, *in vivo* hemodynamics, and ventricular performance before and after ischemia-reperfusion was determined in both strains. Given the important role of mitochondria in heart failure, we also determined whether differences in the development of mitochondrial dysfunction and vulnerability to stress-induced opening of the PTP could explain the strain-dependence in the susceptibility to decompensation.



## METHODS

### *Animal care:*

All experiments on animals were approved by the Université de Montréal Institutional Animal Care Committee and conducted according to the directives of the Canadian Council on Animal Care. The inbred WKHA/Cfd rats used in this study originated from a colony maintained at the IRCM, as registered with the Institute of Laboratory Animal Resources. Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Indianapolis, IN, USA) and male WKHA rats were housed in pairs and kept in a temperature-, humidity-, and light-controlled (12:12 h light-dark cycle) environment. The animals had free access to standard rat chow and water.

### *Induction of chronic volume overload and isolation of mitochondria:*

Induction of the aorto-caval fistula was performed at 7 weeks of age as described elsewhere [18].

### *Morbidity and mortality assessment:*

In order to assess the time course of morbidity and mortality, SD and WKHA animals ( $n= 22$  and  $11$ , respectively) were evaluated weekly for signs of CHF. For this purpose, overt CHF (*i.e.*, morbidity) was defined as a significant increase in body weight (*i.e.*,  $\geq 50$  g in a 7-day period) together with strenuous respiration and/or pitting edema. The temporal pattern of survival post-fistula was plotted as the percentage of rats remaining alive that had not developed CHF or succumbed to sudden death.

### *Hemodynamic measurements:*

Rats were sedated by an intramuscular administration (1.5 l/g body wt) of a 1:1 mix of a sedative (2.5 mg/ml droperidol) and an analgesic (50 g/ml fentanyl). A Fr-2 single sensor pressure catheter (Millar Instruments; Houston, TX) was inserted within the right carotid artery and pushed within the LV. Recording signals were

acquired with a PowerLab/8 nSP acquisition system (ADInstruments, Colorado Springs, CO), all signals were analyzed using the accompanying software application, and variables were calculated using the corresponding equations as described previously [19]. Animals were then anaesthetized (ketamine / xylazine : 61.5/7.7 mg/kg, i.p.) and the heart and lung dissected rapidly. Biventricular weight, individual weight of the left (LV, plus septum) and right ventricles (RV) as well as lung weight were determined and normalized against that of the tibia.

*Isolation of mitochondria for in vitro functional studies:*

For measurements of mitochondrial performance *in vitro*, hearts were sampled at 4 and 12 weeks post-surgery and mitochondria were isolated as previously described [20]. Hearts were rapidly excised and immersed into ice-cold isolation medium (buffer A, in mM: 300 sucrose, 10 Tris-HCl, 1 EGTA, pH 7.3) and weighed. Ventricular tissue was minced with scissors in 5 ml of buffer A supplemented with 0.2% fatty acid free bovine serum albumin (BSA) and homogenized using a Polytron tissue tearer (~3 s at a setting of 3). The homogenate was then incubated with the protease Nagarse (1.5 mg/g) for 5 min and further homogenized at the same settings. The homogenate volume was completed to 30 ml with buffer A + 0.2% BSA and centrifuged at 800 x g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was decanted and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. The pellet obtained was re-suspended in buffer B (in mM: 300 sucrose, 0.5 EGTA, 10 Tris-HCl, pH 7.3) and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. After repeating this washing step twice, the final mitochondrial pellet was resuspended in 0.3 ml of buffer B to a protein concentration of ~20 mg/ml. All procedures were carried out at 4°C. Protein determinations were performed using the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA), with BSA as a standard.

*Anoxia-reoxygenation in vitro:*

These experiments were carried as previously described [20]. Briefly, mitochondria (2 mg of protein) were placed in an air-tight, temperature-controlled

chamber (30°C) equipped with an oxygen electrode in 1 ml of buffer A (in mM: 110 KCl, 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 MOPS, 5 glutamate, and 2.5 malate, pH 7.4) that had previously been equilibrated at ambient *p*O<sub>2</sub> (~250 nmol O<sub>2</sub>/ml). Mitochondria consumed the oxygen available in ~5 min and anoxia was pursued for a further 20 min. Reoxygenation was produced by removing the sealed cap and gently blowing room air at the surface of the stirred mitochondrial suspension in order to reach a stable *p*O<sub>2</sub> within 1-2 min. After 20 min of reoxygenation a 300 µl aliquot of the suspension was transferred in a second chamber for the assessment of mitochondrial respiratory function as described below. Experiments were performed in the absence and presence of the PTP inhibitor cyclosporin A (CsA, 1 µM).

*Mitochondrial respiratory function:*

Mitochondria (0.3 mg of protein) were incubated in 1 ml of buffer A. After performing basal ADP-restricted measurements (*V*<sub>0</sub>), 1 mM ADP was added to measure the maximal rate of oxidative phosphorylation (*V*<sub>ADP</sub>) in the presence of glutamate-malate (5:2.5 mM). Respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio *V*<sub>ADP</sub> / *V*<sub>0</sub> [21].

*Calcium challenge:*

Mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated in 1.5 ml of buffer B (in mM: 250 sucrose, 10 MOPS, 0.05 EGTA, 10 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2) containing either glutamate-malate (5:2.5 mM) or succinate + rotenone (5 mM, 1 µM). Changes in extra-mitochondrial calcium concentration were monitored fluorimetrically (Hitachi, F4500 or Ocean Optics SD2000 spectrofluorometer) using Calcium-Green 5N (1 µM, excitation-emission: 505-535 nm) as described by Ichas et al. [22]. Residual calcium concentration was adjusted to the same level at the beginning of every experiment by adding a small amount of EGTA. Calcium pulses (42 nmol/mg protein) were added at 2 min intervals until a Ca<sup>2+</sup>-induced-Ca<sup>2+</sup> -release was observed. Calcium retention capacity (CRC) was taken as the total amount of Ca<sup>2+</sup> accumulated by mitochondria before the Ca<sup>2+</sup> pulse triggering Ca<sup>2+</sup> release [22]. In parallel experiments,

mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) was measured under the same experimental conditions. For this purpose, Calcium-Green 5N was replaced by rhodamine 123 (0.2  $\mu$ M: excitation-emission, 503-525 nm) and measurements were performed as described by Emaus et al. [23]. Mitochondrial release of rhodamine 123 after uncoupling with 100 nM carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was taken as an index of membrane potential.

*Isolated heart perfusion:*

Hearts were rapidly excised and immersed in ice-cold Henseleit (KH) buffer (in mM: NaCl 119, KCl 4.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub>, 24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 11, pH 7.4). The aorta was cannulated and the coronary arteries perfused with KH buffer in the Langendorff mode at a constant pressure of 70 mm Hg. This pressure is recommended for heart perfusion with crystalline buffers in order to limit edema, which occurs when physiological perfusion pressures (90-100 mm Hg) are used [24]. In addition, an incision was made in the pulmonary artery to favor drainage of the coronary effluent. The perfusion solution was oxygenated with 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C throughout the perfusion. Hearts were maintained in a water-jacketed chamber maintained at 37°C and were not paced. Perfusion pressure was monitored by use of an in-line pressure transducer connected to an in-line data acquisition system (Powerlab 8/30, ADInstruments, Colorado Springs, CO). Ventricular pressure was monitored via a separate pressure transducer connected to a fluid-filled latex balloon inserted in the left ventricle via the left atrium. The size of the balloon was adjusted to take into account differences in the size of the left ventricular cavity and was inflated to provide an end-diastolic pressure of ~10 mm Hg. Hearts were submitted to a protocol consisting of 30 min of low-flow ischemia (3% of pre-ischemic flow delivered by means of a roller pump), followed by 40 min of reperfusion. Norepinephrine (100  $\mu$ M) was infused by means of a syringe pump during the entire I-R protocol starting 5 min before ischemia in order to mimic the adrenergic stress encountered during I-R.

*Measurement of PTP opening in situ with 2-deoxy [<sup>3</sup>H]glucose*

PTP opening *in situ* was assessed using the [<sup>3</sup>H]DOG entrapment method developed by Halestrap and colleagues [25-27] with minor modifications. In order to load cardiomyocytes with [<sup>3</sup>H]DOG before ischemia-reperfusion, hearts were initially perfused for 10 min with regular KH buffer. Following this stabilization period, hearts were perfused for 20 min with KH buffer supplemented with 0.5 mM 2-deoxy [<sup>3</sup>H]glucose (0.1  $\mu$ Ci.mL<sup>-1</sup>). Hearts were then perfused for 5 additional minutes with normal KH in order to wash-out extracellular [<sup>3</sup>H]DOG and submitted to ischemia-reperfusion as described above or immediately processed for the measurement of baseline mitochondrial [<sup>3</sup>H]DOG entrapment.

At the end of perfusion hearts were removed, weighted and homogenized in 5 ml of ice-cold sucrose buffer (in mM: sucrose 300, Tris-HCl 10, EGTA 2, BSA 5 mg/ml, pH 7.4) with a polytron homogenizer (setting 3 for 5 s) and volume was then completed to 40 ml. An aliquot of the crude homogenate were retained for measurements of [<sup>3</sup>H]DOG and the remainder was immediately centrifuged at 800 x g for 2 min to remove cellular debris. The supernatant was recovered and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. The mitochondrial pellet obtained was washed in 30 ml of sucrose buffer containing no BSA and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. The final mitochondrial pellet was resuspended in 1.0 ml of sucrose buffer without BSA. 100 and 500  $\mu$ l of this mitochondrial suspension were retained for the measurement of citrate synthase (CS) activity and determination of [<sup>3</sup>H]DOG, respectively. In all buffers, a high concentration of EGTA was used in order to favor rapid PTP closure and entrapment of [<sup>3</sup>H]DOG [25]. For the measurement of [<sup>3</sup>H]DOG, crude homogenate and mitochondrial samples were mixed with an equal volume of 5% (w/v) perchloric acid and centrifuged at 10 000 x g for 2 min. Radioactivity of the supernatant (500  $\mu$ l samples) was counted in 10 ml of scintillant.

*Mitochondrial [<sup>3</sup>H]DOG entrapment:*

Calculation of the DOG index was performed as described by Griffiths and Halestrap [25]. This index, which reflects the number of mitochondria in which PTP opening occurred over the perfusion protocol, was expressed as follows:

$$\text{DOG index} = (10^5 \times \text{mitochondrial } [^3\text{H}]\text{DOG} / \text{tissue } [^3\text{H}]\text{DOG}) / \text{CS}.$$

where mitochondrial and tissue [<sup>3</sup>H]DOG are expressed in d.p.m. per unit of CS and d.p.m. per g of wet ventricular tissue respectively. This calculation thus allows mitochondrial [<sup>3</sup>H]DOG entrapment to be normalized for the concentration of mitochondria present in the mitochondrial fraction and for possible differences in the tissue uptake of the tracer [25]. In addition, this index was corrected by the amount of CS recovered per gram of ventricle, which is an indicator of mitochondrial yield [26]. This correction provides a more valid index of PTP opening since it takes into account [<sup>3</sup>H]DOG entrapment in mitochondria that become totally disrupted as a result of I-R and are not recovered during isolation [26, 28].

*Statistical analyses:*

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical differences in morphometric and biochemical parameters were analyzed by means of two-tailed Student's *t*-tests. For myocardial function, pre-ischemic and post-ischemic values were analyzed by means of ANOVA for repeated measures. When multiple comparisons were made, differences were analyzed using one-way ANOVA and Bonferonni post hoc tests were performed to identify the location of significant differences. A corrected *p* value  $<0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### *Morbidity and mortality:*

Figure 1 shows the survival probability of both strains of animals after induction of the ACF. In the SD strain, animals developed CHF starting at 10-12 weeks and the survival probability decreased to 50 and 36% after 23 and 39 weeks of volume overload, respectively. In contrast, the survival probability in the WKHA strain was of 82 % over the same period of time, indicating that the ACF maneuver was much better tolerated than in the SD strain.

### *Morphometric and hemodynamic parameters:*

As disease progression was more rapid in the SD than in WKHA strain, hemodynamic and morphometric characterizations were performed at 2, 4 and 8 weeks post-surgery to determine whether LV remodeling and its consequences were more severe in SD animals. In the WKHA strain, the ratio of biventricular weight on tibial length at 2, 4 and 8 weeks post-surgery was respectively 31, 55 and 79% greater compared with their sham-operated counterparts. In contrast, in the SD strain, the ratio of biventricular weight on tibial length was increased by 51, 100 and 129% at 2, 4 and 8 weeks post-surgery in ACF animals, indicating a more pronounced hypertrophic response to volume overload compared with WKHA rats. This response was due to a greater hypertrophy of the left ventricle in SD rats as no significant difference in right ventricular weight gain was observed between the two strains (Figure 2). Lung weight was significantly increased from the 2nd week post-surgery in ACF animals compared with sham, but no strain difference was observable (Figure 2).

As shown in Figure 3, the ACF maneuver had a relatively modest impact on hemodynamics in both strains. Left ventricular developed pressure was not different from sham at any time points post-surgery and only a modest decrease in contractility and relaxation indexes were observed at 8 weeks post-surgery. On the other hand, in

both strains diastolic pressure was significantly elevated compared with sham at 2 weeks post-ACF, but no further elevations were noted at 4 and 8 weeks.

*Mitochondrial function:*

*In vitro* studies on isolated mitochondria were performed to determine whether the more rapid progression toward decompensation of the SD strain was associated with the appearance of more severe mitochondrial respiratory impairments and/or vulnerability to acute stress than that observed in the WKHA strain. In line with previous results, induction of the ACF in the WKHA strain was not associated with impairment of baseline respiratory function in absence of stress as judged by an absence of change in basal ADP-restricted ( $V_0$ ), maximal ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) respiration, RCR values, and steady state membrane potential ( $\Delta\Psi$  under non-phosphorylating conditions (Table 2). A similar absence of basal functional impairment was also made in the SD strain at 4 and 12 weeks post-surgery.

Mitochondria were also submitted to *in vitro* anoxia-reoxygenation and calcium overload to determine their vulnerability to stress. Figure 4 shows the results of experiments in which the effect of anoxia-reoxygenation on maximal oxidative phosphorylation capacity was examined. In the WKHA strain,  $V_{ADP}$  after 20 min of reoxygenation was significantly reduced in mitochondria from sham animals at 4 and 12 weeks post-surgery ( $84.0 \pm 25.5\%$  and  $54.5 \pm 5.5\%$  of baseline values 4 and 12 weeks post-surgery, respectively). In line with previous data [14], mitochondria from ACF animals were significantly more damaged than their sham counterparts with  $V_{ADP}$  values reaching  $37.8 \pm 7.8\%$  and  $30.2 \pm 2.8\%$  of baseline values at 4 and 12 weeks post-surgery, except when CsA was present during the experiment. In the SD strain, anoxia-reoxygenation also resulted in a significant reduction of  $V_{ADP}$  in mitochondria from sham animals. Similarly, the ACF maneuver resulted in greater respiratory impairment relative to sham, and this difference was no longer significant when the PTP inhibitor CsA was present. However, the amplitude of respiratory dysfunction induced by the ACF was similar in the two strains.



Figure 5 shows the results of experiments in which the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$ -induced opening of the PTP was assessed. In WKHA animals, no significant difference in calcium retention capacity (CRC) was observed between mitochondria from sham and ACF animals 4 weeks after surgery. However, at 12 weeks, CRC was  $28.9 \pm 6.9$  and  $21.1 \pm 6.7\%$  lower in the ACF group when the mitochondria were energized with glutamate-malate and succinate-rotenone, respectively. In the SD strain, the reduction in CRC induced by the ACF was already observable at 4 weeks suggesting that sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  induced PTP opening may have developed faster than in the WKHA strain. However, this phenomenon did not increase in severity and by 12 weeks, the reduction in CRC secondary to the ACF was of similar amplitude in both strains.

*Response to ischemia-reperfusion:*

In order to further evaluate the differential impact of the ACF on both strains, contractile function was assessed in isolated perfused hearts under well-perfused conditions as well as during reperfusion after ischemia. Figure 6 and 7 show the evolution of left ventricular developed pressure (LVDP) and rate-pressure product (RPP) during the perfusion protocol. In both strains of animals, the ACF did not result in significant alterations of pre-ischemic contractile function both at 4 and 12 weeks post-surgery. However, inter-strain differences in functional recovery were evident during reperfusion. In WKHA rats, no significant difference in the recovery of LVDP and RPP was observed between sham and ACF at 4 weeks. However at 12 weeks, functional recovery of ACF hearts was in average  $14 \pm 1\%$  lower than in their sham counterparts. In contrast, in the SD strain, the ACF was already associated with impaired recovery at 4 weeks, and at 12 weeks nearly none of the ACF hearts recovered measurable functions (Table 1).

Figure 8 shows the mitochondrial  $[3\text{H}]$  DOG entrapment index which provide a quantitative assessment of the number of mitochondria that have undergone PTP

opening in the heart during ischemia-reperfusion [25]. In both SD and WKHA rats, the mitochondrial DOG index was higher in perfused hearts from ACF animals compared with sham at 4 and 12 weeks post-surgery indicating a greater susceptibility to PTP opening of hypertrophied hearts under stress conditions. However, this phenomenon appeared to develop in a similar fashion in the two strains despite marked differences in the functional response to ischemia-reperfusion.

## DISCUSSION

In the present study we provide clear evidence that genetic differences between the SD and WKHA strains results in substantial differences in the susceptibility to progress toward heart failure following a standardized procedure of volume overload, as shown by differences in the temporal response of mortality, ventricular morphometry and function. In SD animals, left ventricular hypertrophy was more pronounced than in their counterparts from the WKHA strain after 2, 4 and 8 weeks of volume overload and this phenomenon was associated with greater contractile dysfunction after ischemia/reperfusion and a faster progression toward heart failure. However, our results indicate that while mitochondrial vulnerability to stress is a common feature associated with disease progression, it does not appear to explain this strain-specific difference in disease progression.

Left ventricular hypertrophy is associated with increased morbidity, progression toward heart failure and mortality [1, 29, 30]. Furthermore, the cardiovascular risk has been reported to increase continuously and proportionally with left ventricular mass [31] while eccentric left hypertrophy is known to lead to a greater risk of systolic dysfunction [1]. The ACF maneuver used in this study increases the workload imposed on the heart by sustained volume overload which leads to eccentric hypertrophy and cardiomyocyte elongation in order to normalize left ventricular end diastolic pressure and diastolic wall stress. However, it has been proposed that a contractile dysfunction might result from an excessive load placed on insufficient myocardial mass and thus, that an inability to normalize function may eventually cause inefficient pump function and transition to heart failure [32]. The rapid development of left ventricular hypertrophy and dilation before the achievement of a stable state of hypertrophy could therefore accelerate the transition toward decompensation and heart failure.

In SD rats, the ACF has been previously associated with an early and progressive decrease in myocardial contractility without any change in cardiac hemodynamic performance, marked hypertrophy and ventricular dilatation [32]. In addition, the same authors have reported an initial occurrence of morbidity and mortality due to congestive heart failure following an ACF at 4 weeks post-surgery, with the incidence of overt heart failure exceeding 50% 14 weeks after the surgery [15]. On the other hand, the WKHA rat also used in the present study is a recombinant inbred strain derived from phenotypic selection and repeated inbreeding of the progeny of the Wistar-Kyoto (WKY)/spontaneously hypertensive rat (SHR) crosses [33]. This rat is normotensive but displays increased cardiac mass at baseline and enhanced susceptibility to load-induced ventricular remodeling due to the presence of the quantitative trait locus Cm24 on chromosome 5 [17, 33]. However, we have previously observed in WKHA rats that, after 12 weeks of chronic volume overload induced by an ACF, a marked compensated hypertrophy is present without any sign of congestive heart failure or any mortality [14] suggesting that these rats may have a lower susceptibility to decompensation than SD rats in response to an identical chronic volume overload. The results reported in the present study concur with those previous observations, since the survival probability after surgery was greater in WKHA compared to SD rats (Figure 1). Furthermore, even if no inter-strain difference was observed in hemodynamic parameters, the extent of left ventricular hypertrophy was greater in SD rats after an ACF and this was associated with a greater and, most importantly, an earlier contractile dysfunction during reperfusion following 30 min of low flow ischemia *in vivo*. Indeed, at 4 weeks post-surgery, SD rats exhibited lower LVDP and RPP values than their sham counterparts whereas no difference was observed between the groups in the WKHA strain. Of note, there are also evidences in the literature that a third strain of rats, the Wistar-Kyoto, is even less susceptible to the ACF maneuver than the WKHA since it exhibits a milder hypertrophic remodeling and no contractile dysfunction 12 weeks after the surgery [17]. These results suggest that the genetic background is a major

determinant of the susceptibility to progress from hypertrophy to heart failure in response to chronic overload.

We have recently shown in WKHA rats submitted to ACF that an increase in the vulnerability of mitochondria to PTP opening develops in the hypertrophied heart when submitted to acute stress at a time when systolic function is normal and in absence of typical respiratory impairments associated with heart failure [14]. Opening of the PTP is known to induce the loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), uncoupling of oxidative phosphorylation, high amplitude swelling of the matrix and the release of several pro-apoptotic factors that are normally sequestered in mitochondria. Importantly, conditions that are known to favor PTP opening such as oxidative stress [34-36], increased diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels [37, 38], and hypoxia and/or ischemia [5, 35] are encountered during pathological ventricular remodeling. Therefore, mitochondrial vulnerability to PTP opening could predispose to the activation of mitochondria-mediated cell death, which is considered an important factor promoting cardiac decompensation [12, 13]. The results obtained in the present study are consistent with our previous findings that, despite the absence of apparent respiratory impairments, mitochondria isolated from ACF animals display a marked vulnerability to PTP opening. However, this phenomenon developed by 4 weeks in both strains of animals and did not increase in severity in SD compared to WKHA rats. Therefore, although mitochondrial dysfunction and PTP opening likely contributes to heart failure [10, 11, 39, 40], it does not appear to be the factor responsible for the difference in susceptibility to heart failure observed between the two strains studied.

Although the factors underlying this strain specificity remain to be established, it has been previously reported that in the ACF model the increased ventricular compliance and ventricular dilation observed during transition to heart failure are associated with changes at the level of the extracellular matrix, such as an increased activity of matrix metalloproteinase and alterations at the level of collagen

which may include decreased collagen interactions with integrin receptors or altered collagen cross-linking [15, 41, 42]. An attractive hypothesis is that, in the SD strain, genetic factors that favor adverse extracellular matrix remodeling could increase the hypertrophic stress imposed to the heart, which would in turn cause the more rapid and pronounced hypertrophy and rapid progression toward decompensation of this strain compared to WKHA. Further studies are required to address this question.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grant MOP-62694 from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). YB is a Junior Investigator of the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MM is supported by a Ph.D. scholarship from FRSQ. AA is supported by a Ph.D. scholarship from NSERC. The work of CFD is supported by CIHR grants MOP-64391 and MOP-74460.

**REFERENCES**

- [1] Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 July 1, 2005;289(1):H8-16.
- [2] Katz AM. Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2002 May;16(3):245-9.
- [3] Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation*. 2001 November 13, 2001;104(20):2492-7.
- [4] Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2000;32(12):2361.
- [5] Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL, Terzic A. Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Sep;35(9):1161-6.
- [6] Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1992 Nov;24(11):1333-47.
- [7] Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2000 Mar;45(4):860-5.
- [8] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*. 2001 Mar 16;88(5):529-35.
- [9] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*. 2007 January 1, 2007;87(1):99-163.



- [10] Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(1-4):1-22.
- [11] Sharov V, Todor A, Imai M, Sabbah H. Inhibition of mitochondrial permeability transition pores by cyclosporine A improves cytochrome c oxidase function and increases rate of ATP synthesis in failing cardiomyocytes. *Heart Failure Reviews*. 2005;10(4):305.
- [12] Regula KM, Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2005;38(1):3.
- [13] van Empel VPM, Bertrand ATA, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular Research*. 2005;67(1):21.
- [14] Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF, Burelle Y. Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006;41(6):998.
- [15] Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Feb;280(2):H674-83.
- [16] Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J Appl Physiol*. 2003 February 1, 2003;94(2):752-63.
- [17] Souzeau E, Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. A Genetic Locus Accentuates the Effect of Volume Overload on Adverse Left Ventricular Remodeling in Male and Female Rats. *Hypertension*. 2006 January 1, 2006;47(1):128-33.
- [18] Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res*. 1990 May;24(5):430-2.

- [19] Souzeau E, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 August 1, 2005;289(2):H715-21.
- [20] Marcil M, Bourduas K, Ascah A, Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 April 1, 2006;290(4):H1549-57.
- [21] Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M. NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jan;38(1):135-43.
- [22] Ichas F, Jouaville, L.S., Mazat, J.P. Mitochondria Are Excitable Organelles Capable of Generating and Conveying Electrical and Calcium Signals. *Cell*. 1997 27 june 1997;89:1145-53.
- [23] Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Jul 23;850(3):436-48.
- [24] Döring HJ, Dehnert, H.,. *The Isolated Perfused Heart West Germany: Biomesstechnick-Verlag* 1988.
- [25] 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.
- [26] 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 Jun 1;549(Pt 2):513-24.
- [27] Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 2000;45(2):360-9.

- [28] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):372-85.
- [29] Benjamin EJ, Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci.* 1999 Mar;317(3):168-75.
- [30] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990 May 31;322(22):1561-6.
- [31] de Simone GG, Verdecchia PP, Pede SS, Gorini MM, Maggioni AP. Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension: the MAVI Study. *Hypertension.* 2002;40(4):470-6.
- [32] Brower GL, Henegar JR, Janicki JS. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1996 November 1, 1996;271(5):H2071-8.
- [33] Deschepper CF, Picard S, Thibault G, Touyz R, Rouleau JL. Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jan;282(1):H149-55.
- [34] Li J-M, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension.* 2002 October 1, 2002;40(4):477-84.
- [35] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):500-8.
- [36] Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell.* 1999 Sep 3;98(5):555-8.
- [37] Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular  $Ca^{2+}$  handling in heart failure. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):556-64.
- [38] Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998 Feb;37(2):290-9.
- [39] Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M, Sabbah HN. Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial

respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;42(1):150-8.

- [40] Nakayama HH, Chen XX, Baines CPCP, Klevitsky RR, Zhang XX, Zhang HH, et al.  $\text{Ca}^{2+}$  and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *The journal of clinical investigation*. 2007;117(9):2431-44.
- [41] Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2006;30(4):604-10.
- [42] Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Chancey AL, Stewart JA. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Failure Reviews*. 2004;9(1):33-42.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Incidence of mortality due to heart failure after the creation of an aortocaval fistula (ACF) in SD and WKHA rats.** Percentage of 22 SD (●) and 11 WKHA (■) rats with an ACF surviving each week.

**Figure 2: Morphometric parameters of SD and WKHA rats 2, 4 and 8 weeks post-surgery.** The figure shows biventricular weight, left ventricular weight, right ventricular weight and lung weight normalised for the tibial length for SD (□) and WKHA (■) rats at 2, 4 and 8 weeks post-surgery. Values are mean  $\pm$  SEM for  $n=7-8$  for each strain and time point. a Significantly different from baseline, b Significantly different from SD  $p<0.05$

**Figure 3: Hemodynamic parameters of SD and WKHA rats 2, 4 and 8 weeks post-surgery.** The figure shows left ventricular systolic pressure (LSVP), diastolic pressure, maximal rate of positive (Dp/dt max) and negative (Dp/dt min) pressure change and tau constant for SD (□) and WKHA (■) rats at 2, 4 and 8 weeks post-surgery. a: significantly different from sham within the same strain. Values are mean  $\pm$  SEM for  $n=7-8$  for each strain and time point. a Significantly different from baseline  $p<0.05$

**Figure 4: Effect of ACF on susceptibility to anoxia-reoxygenation injury.** The figure shows ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) respiration measured before (baseline) and after 20 min of anoxia and 20 min of reoxygenation in SD (A and B) and WKHA (C and D) rats at 4 weeks (A and C) or 12 weeks (B and D) post-surgery. Experiments were carried out in presence or absence of 1  $\mu$ M cyclosporin A (CsA) added before anoxia. Values are mean  $\pm$  SEM for  $n=6-9$  except in the WKHA 4 weeks group ( $n=3$ ). a Significantly different from sham, b Significantly different from baseline  $p<0.05$

**Figure 5: Effect of ACF on the sensitivity to Ca<sup>2+</sup>-induced PTP opening.** The figure shows mean values of Ca<sup>2+</sup> retention capacity (CRC) in sham (■) and ACF (□) mitochondria energized with glutamate:malate (GM; 5:2.5 mM) or succinate (5 mM) in presence of 1 μM rotenone (SR) in SD and WKHA rats at 4 (A and C) and 12 (B and D) weeks post-surgery. Values are mean ± SEM for *n* =6-12 except in the WKHA 4 weeks groups (*n*=3). a Significantly different from sham *P*<0.05.

**Figure 6: Effect of ACF on left ventricular developed pressure during ischemia and reperfusion.** The figure shows the left ventricular developed pressure (LVDP) in sham (●) and ACF (○) hearts submitted to low flow ischemia in presence of adrenergic stress in SD and WKHA rats at 4 and 12 weeks post-surgery. LVDP was calculated as the difference between systolic and diastolic pressure. Values are mean ± SEM for *n* = 6-11. b: significantly different from ACF *p*<0.05.

**Figure 7: Effect of ACF on rate-pressure product during ischemia and reperfusion.** The figure shows the evolution of rate-pressure product in sham (●) and ACF (○) hearts submitted to low flow ischemia in presence of adrenergic stress in SD and WKHA rats at 4 and 12 weeks post-surgery. Values are mean ± SEM for *n* = 6-11. b: significantly different than ACF *p*<0.05.

**Figure 8: Mitochondrial [<sup>3</sup>H]-DOG entrapment in sham and ACF rats after IR**

The figure shows the DOG index normalised for the activity of citrate synthase (CS) recovered in the mitochondrial fraction isolated after reperfusion per g. of ventricular tissue of sham (■) and ACF (□) animals at 4 (Panel A) and 12 (Panel B) weeks post-surgery. Values are mean ± SEM for *n* = 6-11. a Significantly different from sham *p*<0.05

**Table 1. Functional recovery during reperfusion in SD and WKHA rats after 4 and 12 weeks of chronic volume overload.**

|                   | 4 weeks  |                     |        |                     |
|-------------------|----------|---------------------|--------|---------------------|
|                   | SD       |                     | WKHA   |                     |
|                   | Sham     | ACF                 | Sham   | ACF                 |
| No-recovery       | 0/11     | 3/9                 | 0/6    | 0/9                 |
| % recovery        |          |                     |        |                     |
| LVDP<br>(mmHg)    | 48 ± 6   | 26 ± 6 <sup>a</sup> | 39 ± 6 | 37 ± 5              |
| RPP<br>(bpm.mmHg) | 50 ± 8   | 33 ± 9 <sup>a</sup> | 40 ± 6 | 32 ± 5              |
|                   | 12 weeks |                     |        |                     |
|                   |          |                     |        |                     |
|                   |          |                     |        |                     |
| No-recovery       | 0/6      | 7/7                 | 0/9    | 0/8                 |
| % recovery        |          |                     |        |                     |
| LVDP<br>(mmHg)    | 42 ± 4   | 2 ± 4 <sup>a</sup>  | 41 ± 4 | 28 ± 4 <sup>a</sup> |
| RPP<br>(bpm.mmHg) | 45 ± 6   | 0 ± 5 <sup>a</sup>  | 40 ± 4 | 26 ± 4 <sup>a</sup> |

LVDP: left ventricular developed pressure, RPP: rate-pressure product. Values are reported as mean values ± SEM for  $n = 6-9$  in each group. a: significantly different from sham within the same strain  $p < 0.05$ .

**Table 2. Effect of ACF on baseline mitochondrial respiration**

| Group    | Condition        | SD           |              | WKHA         |              |
|----------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|          |                  | Sham         | ACF          | Sham         | ACF          |
| 4 weeks  | V <sub>0</sub>   | 21.3 ± 2.9   | 23.3 ± 2.0   | 20.6 ± 2.4   | 24.2 ± 2.1   |
|          | V <sub>ADP</sub> | 133.1 ± 13.6 | 156.6 ± 10.1 | 158.6 ± 18.6 | 140.8 ± 35.3 |
|          | RCR              | 6.2 ± 0.2    | 6.7 ± 0.2    | 7.7 ± 0.2    | 7.6 ± 0.1    |
| 12 weeks | V <sub>0</sub>   | 30.5 ± 2.7   | 29.1 ± 1.9   | 25.6 ± 1.6   | 25.8 ± 1.2   |
|          | V <sub>ADP</sub> | 182.3 ± 8.2  | 220.2 ± 24.3 | 130.1 ± 11.3 | 153.3 ± 9.0  |
|          | RCR              | 6.4 ± 0.4    | 7.4 ± 0.6    | 5.1 ± 0.3    | 6.0 ± 0.2    |

Basal (V<sub>0</sub>), ADP-stimulated (V<sub>ADP</sub>) and respiratory control ratio (RCR: V<sub>ADP</sub>/V<sub>0</sub>) of mitochondria energized with glutamate:malate (5:2.5mM). Values are reported as mean values ± SEM for *n* = 8-12 in each SD group and WKHA 12 weeks, *n*=3 in the WKHA 4 weeks groups.



Figures

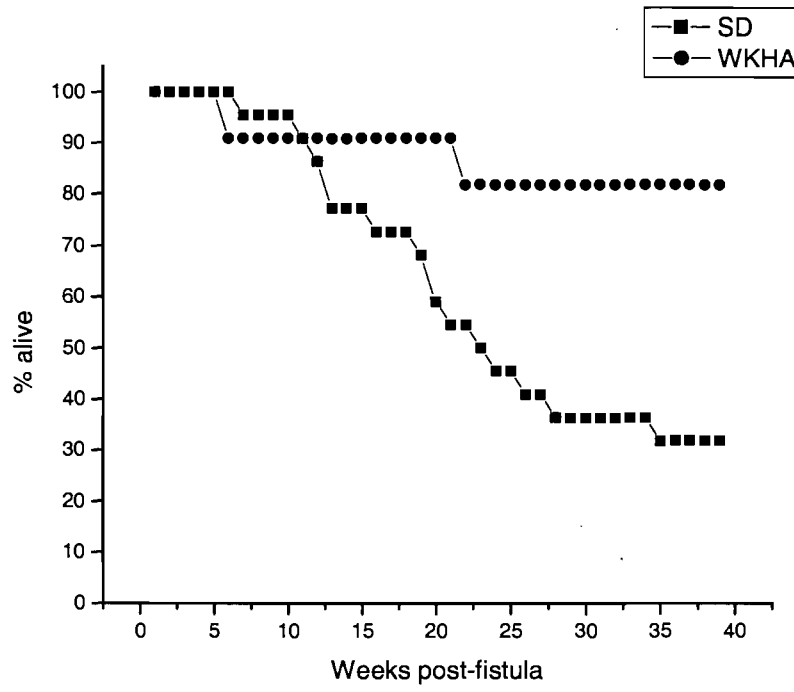


Figure 1

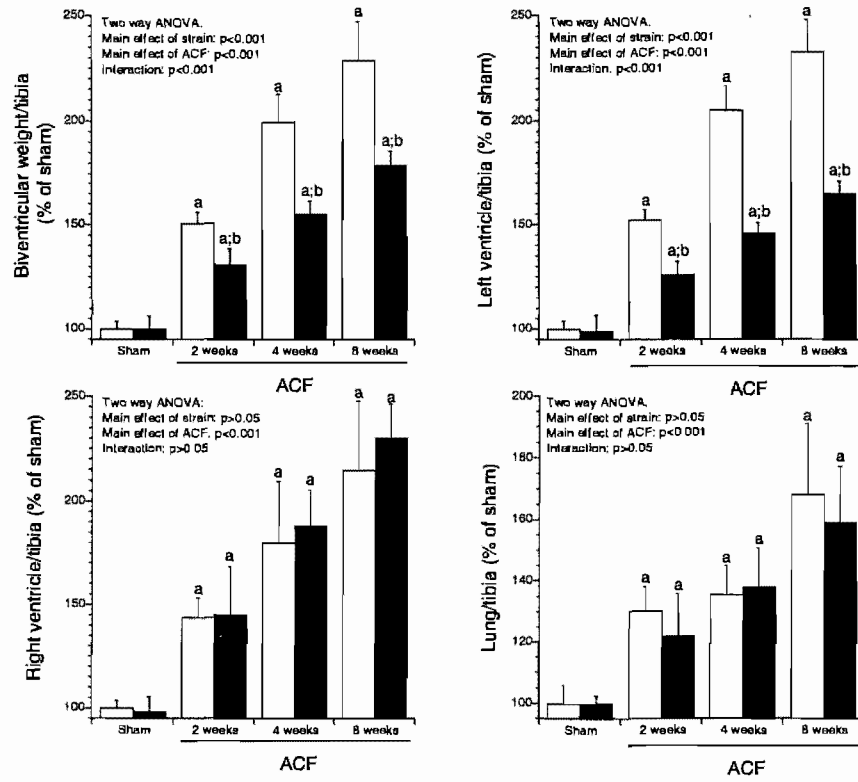


Figure 2

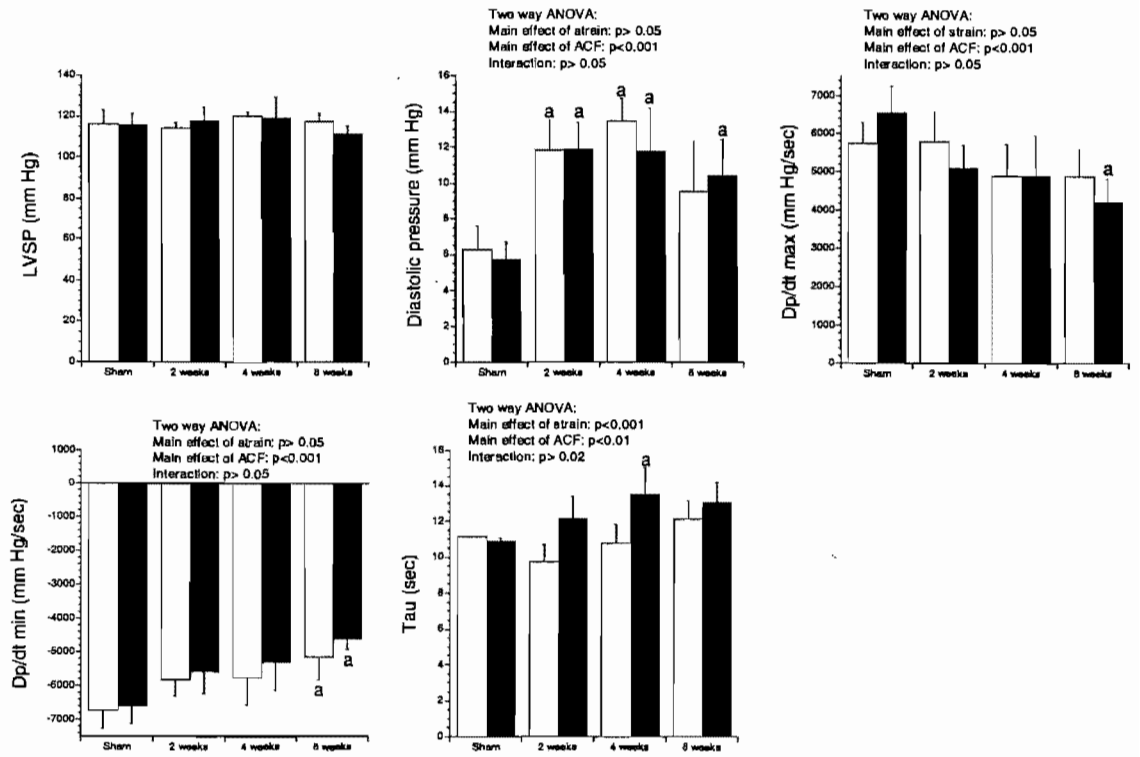


Figure 3

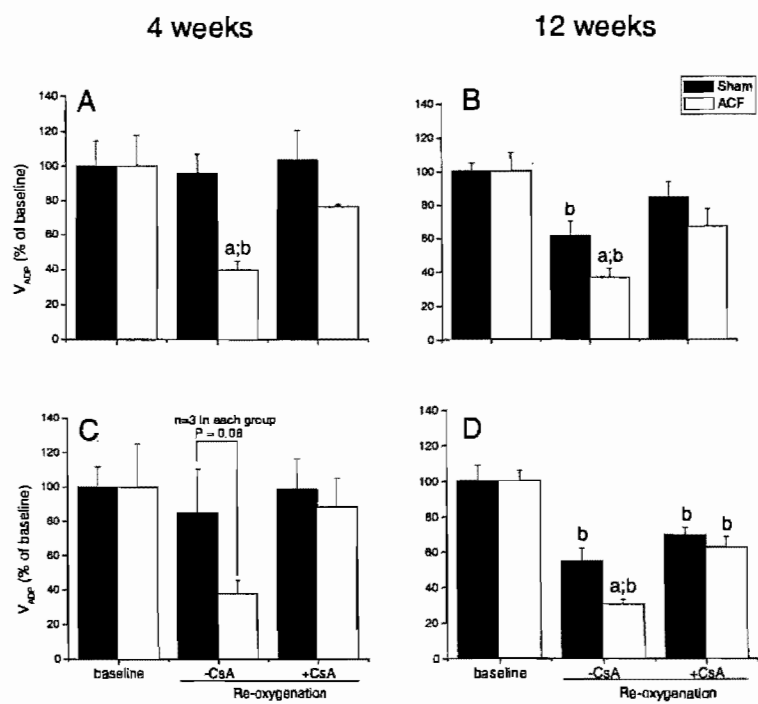


Figure 4

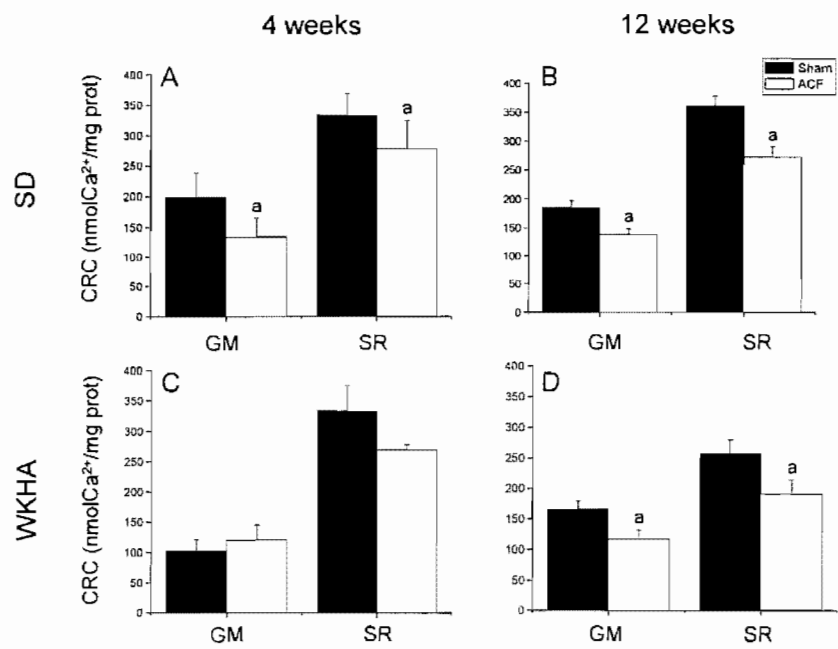


Figure 5

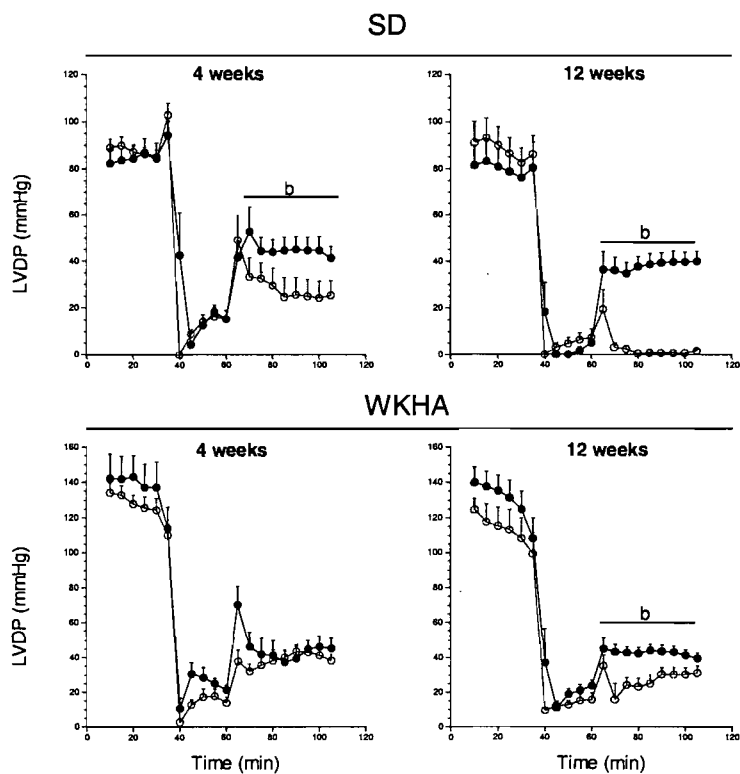
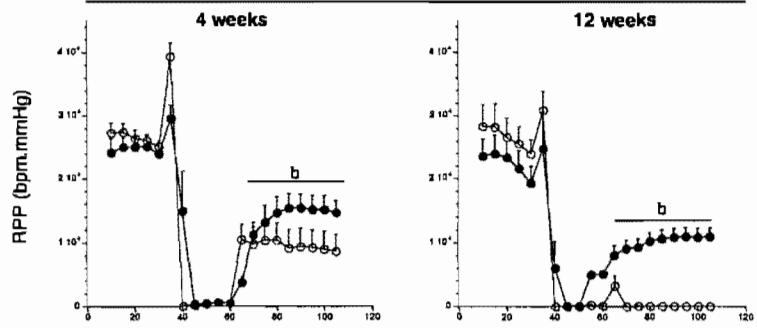


Figure 6

SD



WKHA

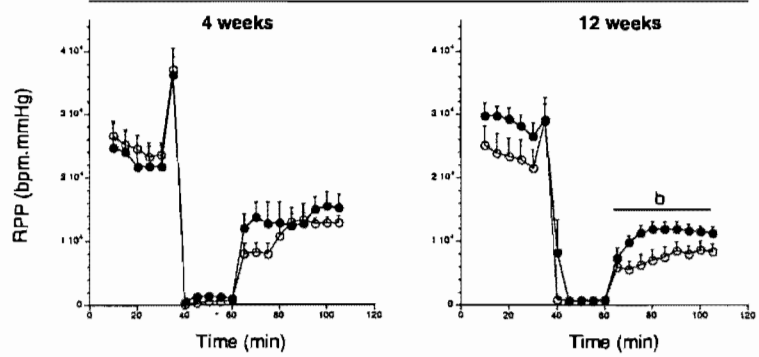


Figure 7

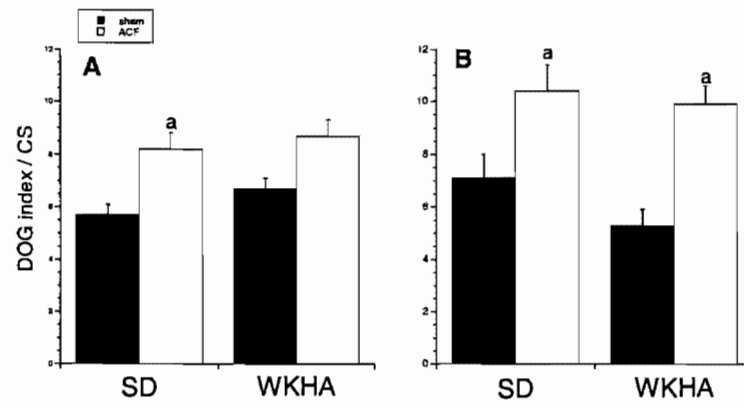


Figure 8



### 3. Discussion

#### 3.1. Discussion générale

##### *3.1.2. Considérations expérimentales*

Les trois études faisant partie de cette thèse ont permis d'approfondir nos connaissances en ce qui a trait à la susceptibilité mitochondriale au stress dans le contexte de l'hypertrophie cardiaque physiologique et pathologique. De plus, elles ont permis d'amener de nouveaux résultats pour mieux comprendre la façon dont l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle mitochondrial (PTP) est régulée dans ces contextes.

Les modèles expérimentaux utilisés dans les trois études de cette thèse (l'entraînement en endurance et la fistule aorto-cavale infra-rénale) ont entraîné le développement d'une hypertrophie ventriculaire. Dans les deux cas, la surcharge volumique (transitoire avec l'exercice, chronique avec la fistule) a entraîné une hypertrophie de type eccentric, avec une augmentation significative de la masse myocardique associée à un élargissement de la chambre ventriculaire. Dans les deux cas, la fonction mitochondriale de base n'a pas été modifiée, ce qui était en accord avec la littérature respective aux deux situations (voir sections 1.4.4.5 et 1.5.4). Toutefois, les deux premières études de cette thèse ont permis de mettre en valeur le fait qu'une fois soumises à un stress aigu, on peut relever des modifications de la fonction des mitochondries de cœurs hypertrophiés ne pouvant pas être décelées à l'état basal. Une diminution de la vulnérabilité mitochondriale au stress pourrait donc être impliquée dans l'effet cardioprotecteur de l'exercice, mais une augmentation de cette même vulnérabilité pourrait contribuer à l'installation d'un cercle vicieux de dysfonction accélérant la transition d'une hypertrophie pathologique compensée vers une hypertrophie pathologique décompensée.

La vulnérabilité mitochondriale au stress serait de plus étroitement reliée à la régulation du pore de perméabilité mitochondrial (PTP) qui, tel que décrit dans la section 1.2.4, est un pore non-spécifique de haute conductance formé par l'assemblage de plusieurs protéines aux points de contact entre les deux membranes mitochondriales. Brièvement, l'ouverture du PTP, favorisée entre autres par une forte concentration de calcium, par une augmentation du stress oxydant et par une déplétion du pool de nucléotides adényliques entraînerait 1) la perte de la force proton-motrice; 2) l'abolition de la synthèse d'ATP; 3) la création d'un gradient de pression osmotique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale et un déplacement d'eau vers la matrice mitochondriale provoquant son gonflement et 4) la rupture de la membrane externe mitochondriale permettant la sortie d'ions (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), des nucléotides pyridiniques contenus dans la matrice ainsi que des protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire (162, 316). En conséquence, une ouverture prolongée du PTP entraînerait le déclenchement de l'apoptose ou de la nécrose dépendamment des conditions présentes dans l'environnement cellulaire lors de l'insulte (voir sections 1.2.3.3.2 et 1.2.4).

Nos études, en utilisant le modèle expérimental de la mitochondrie isolée, ont permis d'approfondir les connaissances disponibles au sujet de la régulation du PTP suite à un entraînement régulier et à une surcharge volémique chronique. Toutefois, bien que ce modèle permette de comprendre la façon dont la fonction mitochondriale peut être modulée en réponse à la présence (ou l'absence) de divers effecteurs, il comporte plusieurs limites expérimentales, dont la principale est de ne pas donner un portrait complet de l'environnement cellulaire ni de l'impact des autres composants cellulaires sur la fonction mitochondriale (et vice versa). Compte-tenu, par exemple, de l'étroite proximité structurale et fonctionnelle entre le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie au niveau de l'homéostasie calcique (101, 245), il est fortement envisageable que la modulation de l'ouverture du PTP observée sur une cellule

intacte puisse différer de celle observée dans une population de mitochondries isolées.

De plus, les tests effectués sur une population de mitochondries isolées reflètent la moyenne des réponses de toutes les mitochondries de la population étudiée. Ainsi, dans un test classique de surcharge calcique (ou oxydante) progressive dans lequel l'ouverture du PTP est confirmée par une relâche du calcium matriciel (identifiée par une augmentation de la fluorescence de la sonde Calcium-Green 5N) ou par un gonflement mitochondrial (identifié par un changement de la diffraction de la lumière à 540nm/540nm), on identifie réellement une ouverture prolongée dans une vaste majorité des mitochondries isolées de la population étudiée. Ce phénomène pouvant s'étendre sur 2 à 30 minutes (ou plus) est probablement causée par un recrutement progressif d'une fraction de plus en plus grande des mitochondries de la population étudiée, la relâche de calcium matriciel d'une partie des mitochondries ayant subi une transition de leur perméabilité membranaire causant l'ouverture du PTP d'une autre sous-population et ainsi de suite (99). Ce phénomène est donc très différent de la transition rapide ayant lieu dans chacune des mitochondries et empêche l'étude de la modulation des stades transitoires d'ouverture du PTP qui pourraient non seulement contribuer à l'homéostasie mitochondriale en équilibrant la composition ionique matricielle à celle du cytoplasme (37, 162), mais aussi contribuer à modifier le contenu cellulaire en ATP et ainsi, la capacité de survie cellulaire (12, 102) (voir section 1.2.4).

D'autre part, dans les trois études présentées dans cette thèse, nous avons soumis les mitochondries isolées à une surcharge calcique progressive afin de déterminer la capacité de ces mitochondries à supporter un stress calcique. Toutefois, il est fort probable qu'*in vivo*, ces mitochondries ne soient jamais exposées à d'aussi fortes concentrations cytosoliques et matricielles de calcium. Il en est de même pour l'étude des fonctions respiratoires avec la mesure de la consommation d'oxygène en

stades 3 et 4 qui n'existent pas de façon distincte *in vivo* (171). De plus, il a été montré que l'osmolarité du médium expérimental utilisé peut influencer les propriétés du PTP et ce, indépendamment des changements de potentiel de membrane, de concentrations des nucléotides adényliques ou de l'état redox (210). Ces résultats renforcent donc l'idée selon laquelle la situation expérimentale *in vitro* peut différer de la situation *in vivo* et indiquent qu'il faut être prudent dans l'interprétation (et l'extrapolation) des résultats obtenus dans nos études.

### ***3.1.2. Pistes de réflexion sur les 3 études présentées dans cette thèse***

Plus précisément, les études faisant partie de cette thèse ont permis de mettre en relief les points suivants :

1. L'entraînement en endurance chez le Rat SD femelle est associé à une diminution de la susceptibilité d'ouverture du PTP en présence de substrats respiratoires du complexe II lors d'un stress aigu (surcharge calcique) et ce, sans changement significatif de la fonction respiratoire basale, du potentiel de membrane, des niveaux endogènes de nucléotides adényliques, de la production de radicaux libres ou du potentiel redox. Compte-tenu de l'implication de la dysfonction mitochondriale et de l'ouverture du PTP dans le déclenchement de la mort cellulaire apoptotique et nécrotique, ce phénomène pourrait contribuer à expliquer l'effet cardioprotecteur de l'entraînement mis en évidence par une meilleure récupération post-ischémie.
2. De plus, dans le tissu cardiaque, tout comme dans le tissu musculaire squelettique (80), la vulnérabilité à l'ouverture du PTP semble être substrat-dépendante, avec une augmentation de la probabilité d'ouverture lorsque des substrats respiratoires du complexe I (glutamate-malate) sont utilisés.

3. Inversement, une hypertrophie pathologique compensée induite par la création d'une fistule aorto-cavale (ACF) chez le Rat mâle WKHA entraîne une augmentation de la susceptibilité mitochondriale au stress aigu (observable tant *in vivo* qu'*in vitro*) associée à une augmentation de la probabilité d'ouverture du PTP et ce, à un moment où la fonction mitochondriale basale, le potentiel de membrane et l'activité enzymatique des principaux complexes de la chaîne respiratoire ainsi que la fonction systolique ne sont pas altérées. Ces résultats sont, à notre connaissance, les premiers à montrer qu'une dysfonction mitochondriale puisse être mise en évidence en situation de stress aigu durant le stade compensé d'hypertrophie cardiaque. Ces augmentations de la susceptibilité mitochondriale au stress et de la probabilité d'ouverture du PTP pourraient donc être des événements importants accélérant la transition vers la décompensation cardiaque.
  
4. L'effet d'une fistule aorto-cavale est différent entre les souches de rats SD et WKHA, la souche SD développant une hypertrophie ventriculaire et une dysfonction contractile en réponse à un stress aigu plus marquée ainsi que des symptômes de défaillance cardiaque plus rapidement, confirmant l'importance du remodelage ventriculaire comme un déterminant important de l'apparition de la dysfonction contractile et de la progression vers la décompensation.
  
5. La susceptibilité mitochondriale au stress et la probabilité d'ouverture du PTP *in vivo* et *in vitro* sont augmentées en réponse à une fistule aorto-cavale chez le Rat SD et WKHA.

6. Toutefois, cette modulation de la vulnérabilité mitochondriale n'apparaît pas plus tôt chez le Rat SD, suggérant que ce phénomène ne soit pas responsable de la différence de susceptibilité à la décompensation cardiaque entre les deux souches de rats.

### 3.1.2.1. *Vulnérabilité mitochondriale et expression de CypD*

Tel que mentionné dans la discussion de notre première étude (voir section 2.1), à notre connaissance seulement deux études s'étaient déjà intéressées à l'effet de l'entraînement en endurance sur la prise de calcium mitochondriale (219, 271) et les auteurs n'avaient pas évalué la probabilité d'ouverture du PTP (185). De plus, au moment de la soumission de notre manuscrit, aucune donnée n'était disponible au sujet de l'effet de l'entraînement d'endurance sur les paramètres impliqués dans la régulation du PTP. Notre étude a donc contribué à enrichir les connaissances à ce sujet. Récemment, Kavazis et al. (150) ont montré une modification du contenu en ANT et en cyclophiline D, deux éléments putatifs du PTP, après un entraînement de courte durée (5 jours de course sur tapis roulant chez le Rat SD mâle). Dans leur étude, les contenus en ANT et en CypD des mitochondries intermyofibrillaires isolées de cœurs de rats entraînés était de 4.5 et 6 fois inférieurs, respectivement, à ceux obtenu dans des cœurs sédentaires (150). De plus, la relâche de cytochrome c en réponse à un stress oxydant (ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) était réduite suite à l'entraînement au niveau des mitochondries intermyofibrillaires et les auteurs ont associé ces résultats à une diminution du taux maximal d'ouverture ( $V_{max}$ ) du PTP suite à l'ajout de calcium et de tert-butyl-hydroperoxyde. Leurs résultats n'ont toutefois pas été confirmés par l'ajout d'un inhibiteur de l'ouverture du PTP tel que CsA, sangliféhrinA, NIM 811 ou trifluoperazine. Il a récemment été montré que l'inactivation des gènes de deux isoformes d'ANT au niveau du foie n'élimine pas la possibilité de déclencher l'ouverture du PTP, mais que de plus fortes doses de calcium sont alors nécessaires pour faire passer le PTP en conformation ouverte, suggérant un rôle d'ANT dans la sensibilité mitochondriale au calcium (157). De même, on observe chez la souris

Ppif<sup>-/-</sup> n'exprimant pas la cyclophiline D qu'une quantité significativement accrue de calcium est nécessaire pour provoquer l'ouverture du PTP, suggérant un rôle sensibilisant de CypD dans la régulation du PTP (19, 23, 203, 249). De façon inverse, la surexpression de CypD dans le cœur facilite le déclenchement de l'ouverture du PTP, mais l'utilisation de CsA permet d'inhiber ce phénomène (19). Ainsi, la diminution de l'expression d'ANT et de CypD observée suite à l'entraînement par Kavazis et al. (150) pourrait représenter une adaptation bénéfique et contribuer à l'effet cardioprotecteur de l'entraînement de courte durée en diminuant la probabilité d'ouverture du PTP en période de stress aigu. Toutefois à l'heure actuelle, aucun résultat n'est disponible à ce sujet dans le contexte de l'entraînement d'endurance.

De façon intéressante, dans le cas d'une hypertrophie pathologique, nous avons observé récemment que l'expression de CypD semble être augmentée (Matas et al., en préparation). Dans le but d'approfondir notre compréhension des phénomènes observés dans l'étude 2, nous avons repris les mêmes conditions expérimentales (12 semaines de surcharge volémique chronique induite par la création d'une fistule aorto-cavale chez le Rat WKHA) afin d'évaluer certains paramètres pouvant moduler la probabilité d'ouverture du PTP, dont la production de radicaux libres, la concentration de calcium endogène et la cinétique de prise de calcium mitochondriale ainsi que l'expression protéique et la localisation intracellulaire de la cyclophiline D. Tout comme dans l'étude 2 de cette thèse, les mitochondries isolées de cœurs de rats WKHA 12 semaines post-ACF étaient plus susceptibles à l'ouverture du PTP suite à une surcharge calcique et ce, même si elles avaient une fonction respiratoire basale similaire à celle observée dans le groupe contrôle. De plus, la création d'une fistule n'a entraîné aucune modification significative de la cinétique de prise de calcium mitochondriale et une augmentation non significative de la concentration de calcium endogène a été observée dans les mitochondries ACF. Toutefois, l'expression protéique de CypD était de 80% plus élevée dans les mitochondries ACF que dans les mitochondries contrôle. De plus, le

recrutement de CypD à la membrane mitochondriale était 3.8 fois plus élevée dans les mitochondries ACF que dans les mitochondries sham et ce, en l'absence de stress, suggérant que ce phénomène puisse être représentatif des conditions *in vivo* (Matas *et al.*, en préparation). Le recrutement de la CypD à la membrane est considéré comme un élément déterminant dans la régulation du PTP en favorisant un changement dans la conformation de ses éléments putatifs et en favorisant son ouverture (61, 109). De plus, en condition de stress oxydant aigu *in vitro* associée à une ouverture accrue du PTP, on observe aussi une augmentation significative du recrutement membranaire de CypD (56).

Une modulation de la susceptibilité d'ouverture du PTP par un changement du niveau d'expression de CypD pourrait être impliqué tant dans l'effet cardioprotecteur observé à l'exercice que dans la détérioration de la fonction cardiaque suite à une hypertrophie pathologique. Récemment, il a été montré que la taille de l'infarctus suite à une ischémie-reperfusion est diminuée chez la Souris *Ppif*<sup>-/-</sup> (19, 179, 203). Toutefois, chez cette Souris, l'effet cardioprotecteur de diverses interventions pharmacologiques (diazoxyde, bradykinine, CsA, SfA, necrostatine) et de pré- et post-conditionnement ischémique est annulé suggérant fortement que le PTP puisse jouer un rôle majeur dans l'effet cardioprotecteur, peut-être en modulant le degré de stress cellulaire par des ouvertures transitoires lors de la phase de pré-conditionnement (178, 179). De plus, l'utilisation de la Souris *Ppif*<sup>-/-</sup> dans un modèle de défaillance cardiaque induite par l'utilisation de doxorubicine a permis de montrer que l'inhibition de l'ouverture du PTP diminue la vulnérabilité cellulaire à la nécrose suite à une surcharge calcique induite par une surexpression des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (entraînant une augmentation de l'activation des canaux calciques de type L et de la phosphorylation des récepteurs à la ryanodine du réticulum sarcoplasmique) et ce, indépendamment des niveaux d'expression de Bcl-2 (204). La perte d'un nombre important de myocytes viables par nécrose pourrait donc entraîner



la transition vers la défaillance cardiaque (91) possiblement en partie via une ouverture plus importante du PTP (204). Ces hypothèses restent toutefois à vérifier.

### ***3.1.2.2. Vulnérabilité mitochondriale et production de ROS***

De façon intéressante, Matas et al. (en préparation) ont aussi observé une augmentation significative de la production de radicaux libres par le complexe I dans les mitochondries de cœur ACF. Ide et al. (132) avaient déjà montré un tel phénomène au niveau du cœur défaillant, mais à notre connaissance aucune autre étude n'avait mis le phénomène en évidence dans un cœur compensé. Il est possible qu'une augmentation de la production de ROS contribue au recrutement de CypD à la membrane mitochondriale, augmentant ainsi la probabilité d'ouverture du PTP (56). Dans une telle situation, les mitochondries de cœurs hypertrophiés seraient plus vulnérables aux conditions de stress aigu (e.g. stress oxydant (53, 89, 173), augmentation des niveaux de calcium lors de la diastole (309), hypoxie et/ou ischémie locales (89, 215)) lors du remodelage ventriculaire.

D'ailleurs, nous avons montré dans notre première étude que tout comme dans le muscle squelettique, une augmentation du flux d'électrons à travers le complexe I pourrait sensibiliser la mitochondrie cardiaque et augmenter la probabilité d'ouverture du PTP. Dans le muscle squelettique, ce phénomène est indépendant d'autres régulateurs du PTP tels que l'état redox, le potentiel de membrane, le pH ou la production de radicaux libres (28, 80, 171). Dans le cœur, nous n'avons pas non plus observé d'effets de l'entraînement ni de l'hypertrophie compensée sur la fonction respiratoire basale, le potentiel de membrane, les niveaux endogènes de nucléotides adényliques et le potentiel redox. Toutefois, dans les deux situations nous avons observé une augmentation significative de la capacité de rétention calcique mitochondriale en présence de substrats respiratoires du complexe II (succinate) et ce, en présence ou non de roténone, un inhibiteur du complexe I.

D'autre part, nous n'avons pas observé avec l'entraînement de différence au niveau de la production basale de radicaux libres, mais d'autres auteurs ont observé une diminution de la production de  $H_2O_2$  en présence de calcium (277) et une diminution de la peroxydation des lipides suite à un bref épisode d'anoxie-réoxygénation *in vitro* (16). Ces auteurs ont utilisé des rats mâles de souches différentes et des protocoles d'entraînement différents de ceux utilisés dans notre étude, ce qui pourrait en partie expliquer les différences au niveau des résultats. Toutefois, les résultats obtenus par Starnes et al. (277) et Ascensao et al. (16) suggèrent que lorsque les mitochondries sont soumises à un stress aigu, qu'il soit de nature calcique ou oxydante, une diminution de la vulnérabilité mitochondriale pourrait être mise à jour, comme ce fut le cas lors des tests de surcharge calcique dans notre étude. D'ailleurs, suite à une anoxie-réoxygénation *in vitro*, la fonction respiratoire des mitochondries isolées de cœurs de rats entraînés est mieux maintenue que celle des mitochondries de cœurs de rats sédentaires (16). Ces auteurs n'ont toutefois pas évalué la probabilité d'ouverture du PTP dans ce contexte, ce qu'il serait intéressant d'investiguer dans le futur.

### ***3.1.2.3. Vulnérabilité mitochondriale et susceptibilité à la décompensation cardiaque***

La troisième et dernière étude présentée dans le cadre de cette thèse avait pour but de déterminer si une augmentation de la vulnérabilité mitochondriale au stress pouvait être impliquée dans les différences au niveau du remodelage ventriculaire et de la susceptibilité à la décompensation cardiaque observées entre deux souches génétiquement distinctes, soit le Rat Sprague-Dawley et le Rat WKHA. Tel que mentionné plus haut, cette étude nous a tout d'abord permis d'observer qu'un même stimulus hypertrophique (fistule aorto-cavale) peut entraîner un remodelage différent dans deux souches de Rat génétiquement différentes. Toutefois, même si le remodelage plus rapide observé chez le Rat SD était aussi associé à une détérioration

plus rapide de la fonction contractile lors de l'ischémie-reperfusion, nos résultats ne nous permettent pas d'associer ce phénomène à une ouverture plus prononcée ou plus précoce du PTP dans cette souche.

Plusieurs facteurs, dont l'augmentation de la perte de cardiomyocytes par apoptose (236), l'activation de systèmes neuroendocriniens (e.g. rénine-angiotensine-aldostérone et adrénargique), l'augmentation du stress oxydant ou l'activation accrue des métalloprotéinases matricielles (136, 214) ont été proposés pour expliquer la transition entre l'état d'hypertrophie compensés et la défaillance cardiaque. D'ailleurs, suite à la création d'une fistule aorto-cavale chez le Rat SD, une augmentation significative de l'activité des métalloprotéinases matricielles est observée suite à la transition vers la décompensation (40). De plus, une augmentation de l'expression des récepteurs  $\beta$ -adrénargiques est aussi observée dans les mêmes conditions expérimentales (297). À notre connaissance, aucune autre étude ne compare les souches SD et WKHA, mais des résultats préliminaires obtenus récemment dans notre laboratoire nous suggèrent qu'une différence au niveau de la géométrie initiale de la cavité ventriculaire et du remodelage de la matrice de collagène en réponse à la création d'une fistule aorto-cavale pourrait du moins en partie, expliquer les différences de susceptibilité à la décompensation cardiaque observées entre ces deux souches de rats (Ascah et al., en préparation). En effet, on observe chez le Rat SD un volume de la cavité ventriculaire ainsi qu'une compliance supérieures, mais une quantité de collagène inférieure à celles observées chez le Rat WKHA. De plus, suite à la création d'une fistule aorto-cavale, une augmentation supérieure de la tension de paroi est mesurée dans le cœur isolé perfusé du Rat SD, ce qui pourrait entraîner le remodelage hypertrophique plus rapide dans cette souche en comparaison avec le Rat WKHA (Ascah et al., en préparation). La discussion des divers mécanismes potentiellement impliqués dans la transition vers la défaillance cardiaque dépasse cependant le contexte de cette thèse. Toutefois, même si la troisième étude ne permet pas de positionner le degré d'ouverture du PTP comme un

facteur expliquant la différence de susceptibilité entre les deux souches, il n'en demeure pas moins que la vulnérabilité mitochondriale au stress aigu et un changement de la régulation de l'ouverture du PTP semblent être « au cœur » du phénomène de remodelage et de défaillance cardiaque.

#### 4. Conclusion

En conclusion, les résultats de nos études soulignent que la régulation du pore de perméabilité transitionnelle mitochondrial peut être modifiée par un stimulus hypertrophique physiologique ou pathologique. De plus, un stimulus cardioprotecteur tel que l'entraînement en endurance semble diminuer la susceptibilité à l'ouverture du PTP et ce, sans modifier la fonction mitochondriale de base. Nos résultats sont donc en accord avec les études présentant le PTP comme un élément important du pré- et post-conditionnement ischémique, deux interventions permettant de préserver la fonction cardiaque suite à un épisode d'ischémie-reperfusion. Les résultats obtenus dans la première étude sont, à notre connaissance, les premiers à décrire différents paramètres pouvant moduler le PTP, contribuant ainsi à l'enrichissement des connaissances dans le domaine.

D'autre part, nous avons montré qu'un stimulus entraînant une hypertrophie pathologique peut aussi modifier la régulation du PTP et ce, avant même qu'une dysfonction mitochondriale et contractile soient observées. Nos résultats sont parmi les premiers à montrer dans le cœur hypertrophié qu'une dysfonction mitochondriale ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité à l'ouverture du PTP peuvent être mises en évidence lors d'un stress aigu tant *in vitro* qu'*in vivo* et ce, dans différentes souches de rats. L'augmentation de la susceptibilité mitochondriale au stress ne peut toutefois pas expliquer que différentes susceptibilités à la décompensation cardiaque soient observées entre les Rats SD et WKHA. Cette susceptibilité mitochondriale au stress et l'augmentation de la vulnérabilité à l'ouverture du PTP demeurent par contre des éléments importants de l'évolution vers la défaillance cardiaque, bien que d'autres études doivent être faites pour approfondir nos connaissances à ce sujet.

Pour reprendre l'expression si juste de Hengartner, la mitochondrie est donc non seulement la centrale énergétique de la cellule, elle est aussi son arsenal de guerre (122) et les résultats de nos travaux renforcent le fait que le pore de perméabilité transitionnelle semble être une de ses armes de destruction massive.

## 5. Bibliographie

1. **Abbate A, Bussani R, Amin MS, Vetovec GW, and Baldi A.** Acute myocardial infarction and heart failure: Role of apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 1834-1840, 2006.
2. **Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RAJ, Murphy MP, and Sammut IA.** Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 19: 1088-1095, 2005.
3. **Akita Y, Otani H, Matsuhisa S, Kyoj S, Enoki C, Hattori R, Imamura H, Kamihata H, Kimura Y, and Iwasaka T.** Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2051-2059, 2007.
4. **Al-Nasser I, and Crompton M.** The entrapment of the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator arsenazo III in the matrix space of rat liver mitochondria by permeabilization and resealing.  $\text{Na}^+$ -dependent and -independent effluxes of  $\text{Ca}^{2+}$  in arsenazo III-loaded mitochondria. *Biochem J* 239: 31-40., 1986.
5. **Al-Nasser I, and Crompton M.** The reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem J* 239: 19-29, 1986.
6. **Allard MF.** Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep* 6: 430-435, 2004.
7. **Allard MF, Flint JD, English JC, Henning SL, Salamanca MC, Kamimura CT, and English DR.** Calcium overload during reperfusion is accelerated in isolated hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1551-1563, 1994.
8. **Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, and Chiariello M.** Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem* 268: 18532-18541, 1993.
9. **Anderson PG, Allard MF, Thomas GD, Bishop SP, and Digerness SB.** Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts. *Circ Res* 67: 948-959, 1990.

10. **Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, and Ovize M.** Preconditioning delays  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 61: 115-122, 2004.
11. **Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, and Ovize M.** Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38: 367-374, 2005.
12. **Armstrong JS.** The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion* 6: 225-234, 2006.
13. **Ascensao A, Ferreira R, and Magalhaes J.** Exercise-induced cardioprotection -- biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *International Journal of Cardiology* 117: 16-30, 2007.
14. **Ascensao A, Ferreira R, Oliveira PJ, and Magalhaes J.** Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation. *Cardiovasc Toxicol* 6: 159-172, 2006.
15. **Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ, and Duarte JA.** Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H722-731, 2005.
16. **Ascensao A, Magalhaes J, Soares JMC, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ, and Duarte JA.** Endurance training limits the functional alterations of heart rat mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. *International Journal of Cardiology* 109: 169, 2006.
17. **Baandrup U, Florio RA, Roters F, and Olsen EG.** Electron microscopic investigation of endomyocardial biopsy samples in hypertrophy and cardiomyopathy. A semiquantitative study in 48 patients. *Circulation* 63: 1289-1298, 1981.



18. **Babai L, Szigeti Z, Parratt JR, and Vegh A.** Delayed cardioprotective effects of exercise in dogs are aminoguanidine sensitive: possible involvement of nitric oxide. *Clin Sci (Lond)* 102: 435-445, 2002.
19. **Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, and Molkentin JD.** Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434: 658, 2005.
20. **Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, and Molkentin JD.** Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9: 550-555, 2007.
21. **Baines CP, and Molkentin JD.** STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38: 47, 2005.
22. **Ballinger SW, Patterson C, Yan C-N, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, and Runge MS.** Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 86: 960-966, 2000.
23. **Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, and Bernardi P.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J Biol Chem* 280: 18558-18561, 2005.
24. **Bassuk SS, and Manson JE.** Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Appl Physiol* 99: 1193-1204, 2005.
25. **Benjamin EJ, and Levy D.** Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci* 317: 168-175, 1999.
26. **Benjamin IJ, and McMillan DR.** Stress (Heat Shock) Proteins : Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res* 83: 117-132, 1998.

27. **Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, and Hill JA.** Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H8-16, 2005.
28. **Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155., 1999.
29. **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* 267: 8834-8839, 1992.
30. **Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, and Di Lisa F.** Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264: 687-701., 1999.
31. **Bernardi P, Veronese P, and Petronilli V.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate  $Me^{2+}$  binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem* 268: 1005-1010, 1993.
32. **Boehning D, Patterson RL, and Snyder SH.** Apoptosis and calcium: new roles for cytochrome c and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Cell Cycle* 3: 252-254, 2004.
33. **Bornman L, Steinmann CM, Gericke GS, and Polla BS.** In vivo heat shock protects rat myocardial mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 246: 836-840., 1998.
34. **Bowles DK, Farrar RP, and Starnes JW.** Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol* 263: H804-809., 1992.
35. **Bowles DK, and Starnes JW.** Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart. *J Appl Physiol* 76: 1608-1614., 1994.
36. **Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclohier H, Reed JC, and Kroemer G.** Bcl-2 and Bax regulate

the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19: 329-336., 2000.

37. **Brenner C, and Grimm S.** The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 25: 4744-4756, 2006.
38. **Broekemeier KM, Dempsey ME, and Pfeiffer DR.** Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem* 264: 7826-7830, 1989.
39. **Brookes PS, Zhang J, Dai L, Zhou F, Parks DA, Darley-USmar VM, and Anderson PG.** Increased sensitivity of mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide in cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33: 69, 2001.
40. **Brower GL, and Janicki JS.** Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H674-683, 2001.
41. **Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, and Moore RL.** Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the K<sub>ATP</sub> channel in the rat. *J Physiol* 569: 913-924, 2005.
42. **Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, and Moore RL.** Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol* 95: 2510-2518, 2003.
43. **Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, Caruso NM, Ehlers LB, Johnson MS, and Moore RL.** Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol (Lond)* 564: 619-630, 2005.
44. **Burelle Y, Wambolt RB, Grist M, Parsons HL, Chow JC, Antler C, Bonen A, Keller A, Dunaway GA, Popov KM, Hochachka PW, and Allard MF.** Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1055-1063, 2004.

45. **Canada FdMdCd.** Le fardeau croissant des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux Fondation des Maladies du Coeur du Canada, 2003.
46. **Casey TM, Arthur PG, and Bogoyevitch MA.** Necrotic death without mitochondrial dysfunction-delayed death of cardiac myocytes following oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773: 342-351, 2007.
47. **Chaves EA, Pereira-Junior PP, Fortunato RS, Masuda MO, de Carvalho ACC, de Carvalho DP, Oliveira MF, and Nascimento JHM.** Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 99: 223-230, 2006.
48. **Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, and Lesnefsky EJ.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 2, 2003.
49. **Chen Z, Siu B, Ho Y-S, Vincent R, Chua CC, Hamdy RC, and Chua BHL.** Overexpression of MnSOD Protects Against Myocardial Ischemia/reperfusion Injury in Transgenic Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30: 2281-2289, 1998.
50. **Chernyak BV, and Bernardi P.** The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem* 238: 623-630, 1996.
51. **Chiarugi A.** "Simple but not simpler": toward a unified picture of energy requirements in cell death. *FASEB J* 19: 1783-1788, 2005.
52. **Chicco AJ, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Gardner RT, Fasen GS, Gillenwater CP, and Moore RL.** Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel blockade in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2432-2437, 2007.
53. **Chien KR.** Stress pathways and heart failure. *Cell* 98: 555-558, 1999.

54. **Ciminelli M, Ascah A, Bourduas K, and Burelle Y.** Short term training attenuates opening of the mitochondrial permeability transition pore without affecting myocardial function following ischemia-reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 291: 39-47, 2006.
55. **Clarke SJ, McStay GP, and Halestrap AP.** Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 277: 34793-34799., 2002.
56. **Connern CCP, and Halestrap AAP.** Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *The Biochemical journal* 302 ( Pt 2): 321-324, 1994.
57. **Cooper Gt, Puga FJ, Zujko KJ, Harrison CE, and Coleman HN, 3rd.** Normal myocardial function and energetics in volume-overload hypertrophy in the cat. *Circ Res* 32: 140-148, 1973.
58. **Corwin LM, and Lipsett MN.** Studies on Stability of Rat Liver Mitochondria. II. Relation of the electron transport system to swelling. *J Biol Chem* 234: 2453-2458, 1959.
59. **Costa ADT, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, and Garlid KD.** The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channel opening and  $H_2O_2$  inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 281: 20801-20808, 2006.
60. **Costa ADT, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, and Garlid KD.** The direct physiological effects of mitoK<sub>ATP</sub> opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H406-415, 2006.
61. **Crompton M.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249., 1999.
62. **Crompton M, and Costi A.** A heart mitochondrial  $Ca^{2+}$ -dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates

pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J* 266: 33-39, 1990.

63. **Crompton M, and Costi A.** Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by  $\text{Ca}^{2+}$ , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Eur J Biochem* 178: 489-501, 1988.
64. **Crompton M, Costi A, and Hayat L.** Evidence for the presence of a reversible  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 245: 915-918., 1987.
65. **Crompton M, Ellinger H, and Costi A.** Inhibition by cyclosporin A of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 255: 357-360., 1988.
66. **Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, and Mailer K.** Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res* 63: 543-549, 1988.
67. **Dart CH, Jr., and Holloszy JO.** Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization. *Circ Res* 25: 245-253, 1969.
68. **Demirel HA, Powers SK, Caillaud C, Coombes JS, Naito H, Fletcher LA, Vrabas I, Jessup JV, and Ji LL.** Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc* 30: 1211-1216., 1998.
69. **Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, and Naito H.** Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 91: 2205-2212, 2001.
70. **Dhalla AK, Hill MF, and Singal PK.** Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 28: 506-514, 1996.
71. **Dhalla AK, and Singal PK.** Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 266: H1280-1285, 1994.

72. **Di Lisa F, Canton M, Menabò R, Kaludercic N, and Bernardi P.** Mitochondria and cardioprotection. *Heart Failure Reviews* 12: 249-260, 2007.
73. **Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, and Bernardi P.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic  $\text{NAD}^+$  and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 276: 2571-2575., 2001.
74. **Diwan A, and Dorn GW, II.** Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology* 22: 56-64, 2007.
75. **Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, and Wallimann T.** Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278: 17760-17766, 2003.
76. **Domenech R, Macho P, Schwarze H, and Sanchez G.** Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovascular Research* 55: 561, 2002.
77. **Droge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.
78. **Edinger AL, and Thompson CB.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 663, 2004.
79. **Finaud J, Lac G, and Filaire E.** Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med* 36: 327-358, 2006.
80. **Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, and 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* 273: 12662-12668., 1998.
81. **Forte M, and Bernardi P.** Genetic dissection of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* V37: 121, 2005.
82. **Fournier N, Ducet G, and Crevat A.** Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr* 19: 297-303, 1987.
83. **Francis GS.** Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med* 110 Suppl 7A: 37S-46S, 2001.

84. **French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KKW, and Powers SK.** Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H128-136, 2006.
85. **Frey N, and Olson EN.** Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65: 45-79, 2003.
86. **Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, and Walsh K.** Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101: 660-667, 2000.
87. **Gardner JD, Brower GL, and Janicki JS.** Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *Journal of Cardiac Failure* 8: 101, 2002.
88. **Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, and Kroemer G.** Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 433-442., 2001.
89. **Giordano FJ.** Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115: 500-508, 2005.
90. **Gogvadze V, Orrenius S, and Zhivotovsky B.** Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757: 639-647, 2006.
91. **Goldspink DFDF, Burniston JGJG, and Tan LBL-B.** Cardiomyocyte death and the ageing and failing heart. *Experimental physiology* 88: 447-458, 2003.
92. **Golstein P, and Kroemer G.** Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* 32: 37, 2007.
93. **Green DJ, Naylor LH, and George K.** Cardiac and vascular adaptations to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 677-684, 2006.
94. **Green DR, and Kroemer G.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629, 2004.



95. **Griffiths EJ, and Halestrap AP.** Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 307: 93-98., 1995.
96. **Griffiths EJ, and Halestrap AP.** Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 25: 1461-1469., 1993.
97. **Grover GJ, and Garlid KD.** ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 32: 677-695., 2000.
98. **Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, and Gunter K.** Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285-296., 2000.
99. **Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, and Gavin CE.** Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267: C313-339., 1994.
100. **Gupta M, and Singal PK.** Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy. *Circ Res* 64: 398-406, 1989.
101. **Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, and Pacher P.** The machinery of local  $Ca^{2+}$  signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 529 Pt 1: 69-81, 2000.
102. **Halestrap A.** Biochemistry: a pore way to die. *Nature* 434: 578-579, 2005.
103. **Halestrap AP.** Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 34: 232-237, 2006.
104. **Halestrap AP, Clarke SJ, and Javadov SA.** Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61: 372-385, 2004.
105. **Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, and Kerr PM.** Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 174: 167-172, 1997.

106. **Halestrap AP, and Davidson AM.** Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268: 153-160., 1990.
107. **Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, and O'Toole A.** Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28: 170-177, 2000.
108. **Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, and Woodfield KY.** Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366: 79-94., 1998.
109. **Halestrap AP, McStay GP, and Clarke SJ.** The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166., 2002.
110. **Halestrap AP, Woodfield KY, and 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* 272: 3346-3354., 1997.
111. **Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, and Mehta JL.** Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1346-1352., 2001.
112. **Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL, and Powers SK.** MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 1360-1368, 2004.
113. **Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, and Powers SK.** Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine* 34: 800-809, 2003.
114. **Harris MB, and Starnes JW.** Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2271-2280., 2001.

115. **Hatt PPY.** Cellular changes in mechanically overloaded heart. *Basic Research in Cardiology* 72: 198-202, 1977.
116. **Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, and Yellon DM.** Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 55: 534-543., 2002.
117. **Haworth RA, and Hunter DR.** Allosteric inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J Membr Biol* 54: 231-236, 1980.
118. **Haworth RA, and Hunter DR.** The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the  $\text{Ca}^{2+}$  trigger site. *Arch Biochem Biophys* 195: 460-467., 1979.
119. **He L, and Lemasters JJ.** Heat shock suppresses the permeability transition in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 278: 16755-16760, 2003.
120. **He L, and Lemasters JJ.** Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett* 512: 1-7, 2002.
121. **Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn W-P, and Schaper J.** Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107: 984-991, 2003.
122. **Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776., 2000.
123. **Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, and Hori M.** Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of the American College of Cardiology* 40: 826, 2002.
124. **Hunter DR, and Haworth RA.** The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 195: 453-459, 1979.
125. **Hunter DR, and Haworth RA.** The  $\text{Ca}^{2+}$ -induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Arch Biochem Biophys* 195: 468-477, 1979.

126. **Hunter DR, Haworth RA, and Southard JH.** Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 251: 5069-5077, 1976.
127. **Hunter FE, Jr., and Ford L.** Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions. *J Biol Chem* 216: 357-369., 1955.
128. **Hwang H, Reiser PJ, and Billman GE.** Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 99: 230-236, 2005.
129. **Ichihara S, Yamada Y, Ichihara G, Kanazawa H, Hashimoto K, Kato Y, Matsushita A, Oikawa S, Yokota M, and Iwase M.** Attenuation of oxidative stress and cardiac dysfunction by bisoprolol in an animal model of dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350: 105-113, 2006.
130. **Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, and Takeshita A.** Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88: 529-535, 2001.
131. **Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, and Takeshita A.** Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 86: 152-157, 2000.
132. **Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, and Takeshita A.** Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85: 357-363, 1999.
133. **Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Kasuya Y, and Miyauchi T.** Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. *J Appl Physiol* 101: 151-163, 2006.

134. **Ishikawa Y, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, Sakai Y, Yamamoto M, and Yamaoka Y.** Heat shock preconditioning on mitochondria during warm ischemia in rat livers. *J Surg Res* 87: 178-184., 1999.
135. **Jacobson J, Duchen MR, Hothersall J, Clark JB, and Heales SJR.** Induction of mitochondrial oxidative stress in astrocytes by nitric oxide precedes disruption of energy metabolism. *Journal of Neurochemistry* 95: 388-395, 2005.
136. **Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Chancey AL, and Stewart JA.** The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Failure Reviews* 9: 33-42, 2004.
137. **Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F, and Casademont J.** Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 45: 860-865, 2000.
138. **Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, and Karmazyn M.** NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 38: 135-143, 2005.
139. **Javadov S, and Karmazyn M.** Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 20: 1-22, 2007.
140. **Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, and Halestrap AP.** Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 549: 513-524, 2003.
141. **Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S, and Reimer KA.** Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol* 92: 187-214, 1978.
142. **Jew KN, and Moore RL.** Glibenclamide improves postischemic recovery of myocardial contractile function in trained and sedentary rats. *J Appl Physiol* 91: 1545-1554, 2001.

143. **Ji LL, Fu RG, Mitchell EW, Griffiths M, Waldrop TG, and Swartz HM.** Cardiac hypertrophy alters myocardial response to ischaemia and reperfusion in vivo. *Acta Physiol Scand* 151: 279-290., 1994.
144. **Ji LL, and Mitchell EW.** Effects of Adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats. *Biochem Pharmacol* 47: 877-885, 1994.
145. **Judge S, Jang YM, Smith A, Selman C, Phillips T, Speakman JR, Hagen T, and Leeuwenburgh C.** Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R1564-1572, 2005.
146. **Kammermeier H, Schmidt P, and Jungling E.** Free energy change of ATP-hydrolysis: a causal factor of early hypoxic failure of the myocardium? *J Mol Cell Cardiol* 14: 267-277., 1982.
147. **Kang PM, and Izumo S.** Apoptosis and heart failure : a critical review of the literature. *Circ Res* 86: 1107-1113, 2000.
148. **Kang PM, Yue P, Liu Z, Tarnavski O, Bodyak N, and Izumo S.** Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H72-80, 2004.
149. **Katz AM.** Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther* 16: 245-249, 2002.
150. **Kavazis AN, McClung JM, Hood DA, and Powers SK.** Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 01231.02007, 2007.
151. **Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.
152. **Kerr JFR.** History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471, 2002.
153. **Kihlstrom M.** Protection effect of endurance training against reoxygenation-induced injuries in rat heart. *J Appl Physiol* 68: 1672-1678., 1990.

154. **Kinnally KW, Campo ML, and Tedeschi H.** Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J Bioenerg Biomembr* 21: 497-506, 1989.
155. **Kitsis RN, Peng CF, and Cuervo AM.** Eat your heart out. *Nat Med* 13: 539-541, 2007.
156. **Kobayashi A, Yamashita T, Kaneko M, Nishiyama T, Hayashi H, and Yamazaki N.** Effects of verapamil on experimental cardiomyopathy in the Bio 14.6 Syrian hamster. *J Am Coll Cardiol* 10: 1128-1138, 1987.
157. **Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, and Wallace DC.** The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427: 461-465, 2004.
158. **Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HCA, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn W-P, and Schaper J.** Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92: 715-724, 2003.
159. **Kowaltowski AJ, Castilho RF, and Vercesi AE.** Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495: 12-15., 2001.
160. **Kowaltowski AJ, Vercesi AE, and Fiskum G.** Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. *Cell Death Differ* 7: 903-910, 2000.
161. **Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, and Melino G.** Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12: 1463.
162. **Kroemer G, Galluzzi L, and Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163, 2007.
163. **Kunapuli S, Rosanio S, and Schwarz ER.** "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes. *J Card Fail* 12: 381-391, 2006.
164. **Lajoie C, Calderone A, and Béliveau L.** Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously

- hypertensive rats. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 449: 26-32, 2004.
165. **Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Chandwaney R, Parmelee DJ, and Ji LL.** Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart. *Acta Physiol Scand* 156: 51-60, 1996.
  166. **Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Parmelee DJ, Fiebig R, and Ji LL.** Rigorous swim training impairs mitochondrial function in post-ischaemic rat heart. *Acta Physiol Scand* 160: 139-148, 1997.
  167. **Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, and Nicotera P.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185: 1481-1486, 1997.
  168. **Lemasters JJ.** Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 129: 351, 2005.
  169. **Lennon SL, Quindry J, Hamilton KL, French J, Staib J, Mehta JL, and Powers SK.** Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol* 96: 1299-1305, 2004.
  170. **Lennon SL, Quindry JC, Hamilton KL, French JP, Hughes J, Mehta JL, and Powers SK.** Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H975-980, 2004.
  171. **Leverve XM, and Fontaine E.** Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52: 221-229., 2001.
  172. **Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, and Castelli WP.** Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 322: 1561-1566, 1990.
  173. **Li J-M, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, and Shah AM.** Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 40: 477-484, 2002.
  174. **Li LY, Luo X, and Wang X.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99, 2001.



175. **Libonati JR, Gaughan JP, Hefner CA, Gow A, Paolone AM, and Houser SR.** Reduced ischemia and reperfusion injury following exercise training. *Med Sci Sports Exerc* 29: 509-516., 1997.
176. **Libonati JR, Kendrick ZV, and Houser SR.** Sprint training improves postischemic, left ventricular diastolic performance. *J Appl Physiol* 99: 2121-2127, 2005.
177. **Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, and Nagley P.** On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci* 9: 488-506., 2002.
178. **Lim S, Davidson S, Mocanu M, Yellon D, and Smith C.** The Cardioprotective effect of necrostatin requires the cyclophilin-D component of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 21: 467-469, 2007.
179. **Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, and Yellon DM.** Preconditioning and postconditioning: The essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research* 75: 530-535, 2007.
180. **Lindenmayer GE, Sordahl LA, and Schwartz A.** Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. *Circ Res* 23: 439-450, 1968.
181. **Lipsett MN, and Corwin LM.** Studies on stability of rat liver mitochondria. I. Role of oxidative phosphorylation in swelling. *J Biol Chem* 234: 2448-2452., 1959.
182. **Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, and Ianuzzo CD.** Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol* 269: H320-325., 1995.
183. **Lockshin RA, and Zakeri Z.** Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2405, 2004.
184. **Majno G, and Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15, 1995.

185. **Marcil M, Bourduas K, Ascah A, and Burelle Y.** Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1549-1557, 2006.
186. **Marin-Garcia J, and Goldenthal MJ.** Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review. *J Card Fail* 8: 347-361, 2002.
187. **Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, and Moe GW.** Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res* 52: 103-110, 2001.
188. **Marini M, Lapalombella R, Margonato V, Ronchi R, Samaja M, Scapin C, Gorza L, Maraldi T, Carinci P, Ventura C, and Veicsteinas A.** Mild exercise training, cardioprotection and stress genes profile. *European Journal of Applied Physiology* 99: 503-510, 2007.
189. **McElroy CL, Gissen SA, and Fishbein MC.** Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation* 57: 958-962, 1978.
190. **McFalls EO, Liem D, Schoonderwoerd K, Lamers J, Sluiter W, and Duncker D.** Mitochondrial function: the heart of myocardial preservation. *J Lab Clin Med* 142: 141-148, 2003.
191. **Mital S, Loke KE, Chen JM, Mosca RS, Quaegebeur JM, Addonizio LJ, and Hintze TH.** Mitochondrial respiratory abnormalities in patients with end-stage congenital heart disease. *J Heart Lung Transplant* 23: 72-79, 2004.
192. **Mitchell P, and Moyle J.** Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature* 208: 1205-1206, 1965.
193. **Mitchell P, and Moyle J.** Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria. *Nature* 208: 147-151, 1965.

194. **Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, and Feng Q.** In vivo TNF- $\alpha$  inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1813-1820, 2004.
195. **Moe GW, Naik G, Konig A, Lu X, and Feng Q.** Early and persistent activation of myocardial apoptosis, bax and caspases: insights into mechanisms of progression of heart failure. *Pathophysiology* 8: 183-192, 2002.
196. **Moore RL, and Korzick DH.** Cellular adaptations of the myocardium to chronic exercise. *Progress in Cardiovascular Diseases* 37: 371-396, 1995.
197. **Moore RL, and Palmer BM.** Exercise training and cellular adaptations of normal and diseased hearts. *Exerc Sport Sci Rev* 27: 285-315, 1999.
198. **Moran M, Blazquez I, Saborido A, and Megias A.** Antioxidants and ecto-5'-nucleotidase are not involved in the training-induced cardioprotection against ischaemia-reperfusion injury. *Exp Physiol* 90: 507-517, 2005.
199. **Morán M, Saborido A, and Megias A.** Ca<sup>2+</sup> regulatory systems in rat myocardium are altered by 24 weeks treadmill training. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 446: 161-168, 2003.
200. **Morris JN, Everitt MG, Pollard R, Chave SP, and Semmence AM.** Vigorous exercise in leisure-time: protection against coronary heart disease. *Lancet* 2: 1207-1210., 1980.
201. **Murphy RC, Schneider E, and Kinnally KW.** Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 497: 73-76., 2001.
202. **Murray CJL, and Lopez AD.** Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 349: 1498-1504, 1997.
203. **Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, and Tsujimoto Y.** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434: 652-658, 2005.

204. Nakayama HH, Chen XX, Baines CPCP, Klevitsky RR, Zhang XX, Zhang HH, Jaleel NN, Chua BHBHL, Hewett TETE, Robbins JJ, Houser SRSR, and Molkenin JDJD.  $\text{Ca}^{2+}$  and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *The journal of clinical investigation* 117: 2431-2444, 2007.
205. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, and Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14681-14686., 1998.
206. Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgie FD, Dal Bello B, Semigran MJ, Bielsa-Masdeu A, Dec GW, Israels S, Ballester M, Virmani R, Saxena S, and Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *PNAS* 96: 8144-8149, 1999.
207. Nazareth W, Yafei N, and Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol* 23: 1351-1354., 1991.
208. Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, Pabst T, Ertl G, Hahn D, Ingwall JS, and Kochsiek K. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96: 2190-2196, 1997.
209. Nicolli A, Petronilli V, and Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry* 32: 4461-4465., 1993.
210. Nogueira V, Devin A, Walter L, Rigoulet M, Leverve X, and Fontaine E. Effects of decreasing mitochondrial volume on the regulation of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 37: 25-33, 2005.
211. Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, Yamaguchi O, Zhou H, Kawakami S, Ohta Y, Sami M, Tachibana T, Ishikawa H, Kurosawa H, Kahn RC, Otsu

- K, and Shirasawa T.** Oxidative Stress Causes Heart Failure with Impaired Mitochondrial Respiration. *J Biol Chem* 281: 33789-33801, 2006.
212. **O'Brien PJ, Duke AL, Shen H, and Shohet RV.** Myocardial mRNA content and stability, and enzyme activities of Ca-cycling and aerobic metabolism in canine dilated cardiomyopathies. *Molecular and Cellular Biochemistry* 142: 139-150, 1995.
213. **Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, and Anversa P.** Apoptosis in the Failing Human Heart. *N Engl J Med* 336: 1131-1141, 1997.
214. **Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, and Pfeffer MA.** Controversies in ventricular remodelling. *The Lancet* 367: 356, 2006.
215. **Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL, and Terzic A.** Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1161-1166, 2003.
216. **Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Wing AL, and Hsieh CC.** Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med* 314: 605-613., 1986.
217. **Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, and Noble EG.** Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ Res* 90: 911-917, 2002.
218. **Pastorino JG, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL, and Marcineviciute A.** Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 274: 31734-31739., 1999.
219. **Penpargkul S, Schwartz A, and Scheuer J.** Effect of physical conditioning on cardiac mitochondrial function. *J Appl Physiol* 45: 978-986., 1978.
220. **Petronilli V, Cola C, and 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  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Biol Chem* 268: 1011-1016, 1993.
221. **Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, and Bernardi P.** The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem* 269: 16638-16642, 1994.
222. **Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, and Di Lisa F.** The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* 276: 12030-12034., 2001.
223. **Petronilli V, Szabo I, and Zoratti M.** The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. *FEBS Letters* 259: 137-143, 1989.
224. **Petrosillo G, Di Venosa N, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Paradies G, and Ruggiero FM.** Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia-reperfusion: role of cardiolipin. *FASEB J* 20: 269-276, 2006.
225. **Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C, and Cossarizza A.** Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6458-6463., 1996.
226. **Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL, and Herb RA.** Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol* 265: H2094-2098., 1993.
227. **Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, and Jessup J.** Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 275: R1468-1477., 1998.
228. **Powers SK, Lennon SL, Quindry J, and Mehta JL.** Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol* 17: 495-502, 2002.

229. Powers SK, Quindry, J. C., Kavazis, A. N. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2007.
230. Pozzan T, Magalhaes P, and Rizzuto R. The comeback of mitochondria to calcium signalling. *Cell Calcium* 28: 279-283, 2000.
231. Quigley AF, Kapsa RMI, Esmore D, Hale G, and Byrne E. Mitochondrial respiratory chain activity in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure* 6: 47-55, 2000.
232. Quindry J, French J, Hamilton K, Lee Y, Mehta JL, and Powers S. Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Experimental Gerontology* 40: 416, 2005.
233. Quindry JC, Hamilton KL, French JP, Lee Y, Murlasits Z, Tumer N, and Powers SK. Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis. *J Appl Physiol* 00263.02007, 2007.
234. Ramires PR, and Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H679-688., 2001.
235. Reeve JL, Duffy AM, O'Brien T, and Samali A. Don't lose heart--therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 9: 609-622, 2005.
236. Regula KM, and Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38: 3, 2005.
237. Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, Di Virgilio F, and Pozzan T. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22: 8619-8627, 2003.
238. Rosenberg P. Mitochondrial dysfunction and heart disease. *Mitochondrion* 4: 621-628, 2004.
239. Rossi CS, and Lehninger AL. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 239: 3971-3980., 1964.

240. **Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, and Goldstein S.** Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 24: 1333-1347, 1992.
241. **Sabbah HN, Sharov VG, and Goldstein S.** Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Failure Reviews* 5: 131, 2000.
242. **Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, and Venkatachalam MA.** Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American Journal of Medicine* 107: 489-506, 1999.
243. **Saks VA, Kuznetsov AV, Vendelin M, Guerrero K, Kay L, and Seppet EK.** Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem* 256-257: 185-199, 2004.
244. **Samelman TR.** Heat shock protein expression is increased in cardiac and skeletal muscles of Fischer 344 rats after endurance training. *Exp Physiol* 85: 92-102, 2000.
245. **Saris NE, and Carafoli E.** A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 70: 187-194, 2005.
246. **Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber R-E, Drogaris K, Darmer D, and Holtz J.** Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: Fragile balance of myocyte survival? *Journal of the American College of Cardiology* 39: 481-488, 2002.
247. **Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber R-E, and Holtz J.** Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *Journal of the American College of Cardiology* 40: 2174-2181, 2002.
248. **Scheuer J, and Stezoski SW.** Effect of physical training on the mechanical and metabolic response of the rat heart to hypoxia. *Circ Res* 30: 418-429, 1972.
249. **Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, and Korsmeyer SJ.** Cyclophilin D is a



component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *PNAS* 102: 12005-12010, 2005.

250. **Schwartz A, and Lee KS.** Study of heart mitochondria and glycolytic metabolism in experimentally induced cardiac failure. *Circ Res* 10: 321-332, 1962.
251. **Scorrano L, Nicolli A, Basso E, Petronilli V, and Bernardi P.** Two modes of activation of the permeability transition pore: the role of mitochondrial cyclophilin. *Mol Cell Biochem* 174: 181-184, 1997.
252. **Scorrano L, Petronilli V, and Bernardi P.** On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. *J Biol Chem* 272: 12295-12299., 1997.
253. **Sesso HD, Paffenbarger RS, Jr., and Lee IM.** Physical activity and coronary heart disease in men: The Harvard Alumni Health Study. *Circulation* 102: 975-980, 2000.
254. **sharma AK, Dhingra S, Khaper N, and Singal PK.** Activation of apoptotic processes during transition from hypertrophy to heart failure in Guinea pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 00553.02007, 2007.
255. **Sharov V, Todor A, Imai M, and Sabbah H.** Inhibition of mitochondrial permeability transition pores by cyclosporine A improves cytochrome c oxidase function and increases rate of ATP synthesis in failing cardiomyocytes. *Heart Failure Reviews* 10: 305, 2005.
256. **Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, and Sabbah HN.** Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1757-1762, 1998.
257. **Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M, and Sabbah HN.** Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42: 150-158, 2007.

258. **Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, and Sabbah HN.** Abnormal Mitochondrial Respiration in Failed Human Myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32: 2361, 2000.
259. **Shen X, Zheng S, Metreveli NS, and Epstein PN.** Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 55: 798-805, 2006.
260. **Shephard RJ, and Balady GJ.** Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 99: 963-972., 1999.
261. **Sherratt HS.** Mitochondria: structure and function. *Rev Neurol (Paris)* 147: 417-430, 1991.
262. **Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, and Singal PK.** Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147: 77-81., 1995.
263. **Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, and Netticadan T.** The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37: 101-110, 2004.
264. **Singh RB, Dandekar SP, Elimban V, Gupta SK, and Dhalla NS.** Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease. *Molecular and Cellular Biochemistry* 263: 241-256, 2004.
265. **Siscovick DS, Weiss NS, Fletcher RH, and Lasky T.** The incidence of primary cardiac arrest during vigorous exercise. *N Engl J Med* 311: 874-877., 1984.
266. **Siu PM, Bae S, Bodyak N, Rigor DL, and Kang PM.** Response of caspase-independent apoptotic factors to high salt diet-induced heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42: 678-686, 2007.
267. **Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, and Alway SE.** Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 03-1291fje, 2004.
268. **Siveski-Iliskovic N, Kaul N, and Singal PK.** Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation* 89: 2829-2835, 1994.

269. **Skulachev VP.** Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* V11: 473, 2006.
270. **Solaini G, and Harris DA.** Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 390: 377-394, 2005.
271. **Sordahl LA, Asimakis GK, Dowell RT, and Stone HL.** Functions of selected biochemical systems from the exercised-trained dog heart. *J Appl Physiol* 42: 426-431., 1977.
272. **Sordahl LA, McCollum WB, Wood WG, and Schwartz A.** Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am J Physiol* 224: 497-502, 1973.
273. **Spencer RG, Buttrick PM, and Ingwall JS.** Function and bioenergetics in isolated perfused trained rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H409-417, 1997.
274. **Staib JL, Quindry JC, French JP, Criswell DS, and Powers SK.** Increased temperature, not cardiac load, activates heat shock transcription factor 1 and heat shock protein 72 expression in the heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R432-439, 2007.
275. **Stanley WC, Recchia FA, and Lopaschuk GD.** Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-1129, 2005.
276. **Starkov AA, and Fiskum G.** Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 86: 1101-1107, 2003.
277. **Starnes JW, Barnes BD, and Olsen ME.** Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup>-induced dysfunction. *J Appl Physiol* 102: 1793-1798, 2007.
278. **Starnes JW, Taylor RP, and Park Y.** Exercise improves postischemic function in aging hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H347-351, 2003.
279. **Stoner CD, Ressallat MM, and Sirak HD.** Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts. *Circ Res* 23: 87-97, 1968.

280. **Suleiman MS, Halestrap AP, and Griffiths EJ.** Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 89: 29-46., 2001.
281. **Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, and Kroemer G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446, 1999.
282. **Suzuki K, Murtuza B, Sammut IA, Latif N, Jayakumar J, Smolenski RT, Kaneda Y, Sawa Y, Matsuda H, and Yacoub MH.** Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* 106: I-270-276, 2002.
283. **Swynghedauw B, and Delcayre C.** Biology of cardiac overload. *Pathobiol Annu* 12: 137-183, 1982.
284. **Taylor RP, Harris MB, and Starnes JW.** Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol* 276: H1098-1102., 1999.
285. **Taylor RP, Olsen ME, and Starnes JW.** Improved postischemic function following acute exercise is not mediated by nitric oxide synthase in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H601-607, 2007.
286. **Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, and Dhalla NS.** Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H584-594, 1999.
287. **Thorp DB, Haist JV, Leppard J, Milne KJ, Karmazyn M, and Noble EG.** Exercise training improves myocardial tolerance to ischemia in male but not female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 00363.02006, 2007.
288. **Tiyyagura SR, and Pinney SP.** Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt Sinai J Med* 73: 840-851, 2006.

289. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3: 697-707., 1998.
290. **Tsutsui H.** Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Intern Med* 45: 809-813, 2006.
291. **Turrens JF.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344, 2003.
292. **Van Cruchten S, and Van Den Broeck W.** Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31: 214-223, 2002.
293. **van Empel VPM, Bertrand ATA, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, and De Windt LJ.** Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular Research* 67: 21, 2005.
294. **Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Schumacker PT, and Becker LB.** Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2441-2450., 1997.
295. **Ventura-Clapier R, Garnier A, and Veksler V.** Energy metabolism in heart failure. *J Physiol* 555: 1-13, 2004.
296. **Ventura-Clapier R, Mettauer B, and Bigard X.** Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure. *Cardiovascular Research* 73: 10-18, 2007.
297. **Wang X, Sentex E, Saini HK, Chapman D, and Dhalla NS.** Upregulation of beta-adrenergic receptors in heart failure due to volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H151-159, 2005.
298. **Wang Z-B, Liu Y-Q, and Cui Y-F.** Pathways to caspase activation. *Cell Biology International* 29: 489, 2005.
299. **Wannamethee SG.** Exercise really is good for you. *Heart* 92: 1185-1186, 2006.
300. **Webb SJ, Harrison DJ, and Wyllie AH.** Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol* 41: 1-34., 1997.

301. **Wei YYH, Lu CCY, Lee HHC, Pang CCY, and Ma YYS.** Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 854: 155-170, 1998.
302. **Weir RAP, McMurray JJV, and Velazquez EJ.** Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *The American Journal of Cardiology* 97: 13-25, 2006.
303. **Wikman-Coffelt J, Parmley WW, and Mason DT.** The cardiac hypertrophy process. Analyses of factors determining pathological vs. physiological development. *Circ Res* 45: 697-707, 1979.
304. **Williams MA, Ades PA, Hamm LF, Keteyian SJ, LaFontaine TP, Roitman JL, and Squires RW.** Clinical evidence for a health benefit from cardiac rehabilitation: An update. *American Heart Journal* 152: 835-841, 2006.
305. **Xie JR, and Yu LN.** Cardioprotective effects of cyclosporine A in an in vivo model of myocardial ischemia and reperfusion. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 51: 909-913, 2007.
306. **Xu M, Wang Y, Hirai K, Ayub A, and Ashraf M.** Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H899-908, 2001.
307. **Yamashita N, Baxter GF, and Yellon DM.** Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. *Heart* 85: 331-336, 2001.
308. **Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, and Hori M.** Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 189: 1699-1706, 1999.
309. **Yano M, Ikeda Y, and Matsuzaki M.** Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest* 115: 556-564, 2005.

310. **Yellon DM, Pasini E, Cargnoni A, Marber MS, Latchman DS, and Ferrari R.** The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 24: 895-907., 1992.
311. **ZanESCO A, and Antunes E.** Effects of exercise training on the cardiovascular system: Pharmacological approaches. *Pharmacology & Therapeutics* 114: 307-317, 2007.
312. **Zhang JJ.** Myocardial energetics in cardiac hypertrophy. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 29: 351-359, 2002.
313. **Zhang K-R, Liu H-T, Zhang H-F, Zhang Q-J, Li Q-X, Yu Q-J, Guo W-Y, Wang H-C, and Gao F.** Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis* 12: 1579-1588, 2007.
314. **Zhao Y, Wang Z-B, and Xu J-X.** Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mitochondria. *J Biol Chem* 278: 2356-2360, 2003.
315. **Zimmermann KC, Bonzon C, and Green DR.** The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92: 57-70., 2001.
316. **Zoratti M, and Szabo I.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176., 1995.
317. **Zoratti M, Szabo I, and De Marchi U.** Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta* 1706: 40-52, 2005.