

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

**Implication de la cyclophiline-D et du pore de
perméabilité transitionnelle dans la vulnérabilité
mitochondriale du cœur hypertrophié**

par

Jimmy Matas

Département de Kinésiologie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en Sciences de l'activité physique

Avril 2008

© Jimmy Matas, 2008



Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Implication de la cyclophiline-D et du pore de perméabilité transitionnelle dans la
vulnérabilité mitochondriale du cœur hypertrophié

présenté par :

Jimmy Matas

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Marc Lavoie, président-rapporteur

Yan Burelle, directeur de recherche

Raynald Bergeron, membre du jury

Résumé

L'insuffisance cardiaque est associée à une augmentation de la mort cellulaire ainsi qu'à des dysfonctions de l'oxydation phosphorylante et une relâche de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. Nos études antérieures ont démontré que la vulnérabilité des mitochondries à l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (PTP) en réponse au stress constitue un phénomène précoce qui s'observe dans le cœur hypertrophié compensé et précède l'apparition de dysfonctions systoliques et les atteintes mitochondriales sévères typiquement observée dans le cœur insuffisant. L'objectif de l'étude présentée dans ce mémoire était d'investiguer les mécanismes régulateurs du PTP potentiellement impliqués dans ce phénomène. L'hypertrophie cardiaque a été induite par une fistule aorto-cavale (ACF) chez le rat WKHA et les expériences ont été conduites au stade compensé de la pathologie 12 semaines post-chirurgie. Les mitochondries ont été isolées à partir du tissu cardiaque. La vulnérabilité à l'ouverture du PTP induite par le Ca^{2+} , la fonction respiratoire, la production de radicaux libres (ROS), le potentiel de membrane ($\Delta\Psi$), les niveaux de Ca^{2+} matriciel endogène ainsi que le contenu et la localisation mitochondriale (soluble vs membranaire) de la protéine régulatrice cyclophiline-D (Cyp-D) ont été déterminés. La susceptibilité à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique était supérieure dans le groupe ACF vs témoin ($95 \pm 12 \text{ nmol Ca}^{2+}$ et $145 \pm 11 \text{ nmol Ca}^{2+}$ respectivement, $n=7$, $P < 0.01$), et ce en absence de dysfonctionnement de la respiration basale. Cet effet persistait en présence de cyclosporine A (CsA), un désensibilisateur du PTP bloquant la liaison de la Cyp-D à la membrane interne mitochondriale. Le contenu total en Cyp-D ainsi que son ratio membrane/soluble était supérieur dans le groupe ACF (1.8 ± 0.1 fois, $P < 0.001$ et 3.7 ± 0.8 fois, $P < 0.01$ plus élevé que chez les animaux contrôles). Ce recrutement accru de la Cyp-D aux membranes, connu pour son rôle facilitateur sur l'ouverture du PTP, n'était pas réversible par une incubation des mitochondries avec la CsA. Ces phénomènes étaient également accompagnés par une augmentation de la production de ROS et dans une

moindre mesure du Ca^{2+} matriciel endogène, deux éléments susceptibles d'expliquer le recrutement de la Cyp-D vers les membranes dans le groupe ACF vs contrôle. Ces résultats suggèrent que la modification précoce d'effecteurs clés de l'ouverture du PTP, dont l'expression et la localisation de la Cyp-D, contribuent au développement de la vulnérabilité mitochondriale dans le cœur hypertrophié. Ces changements initiaux pourraient jouer un rôle dans développement des dysfonctions mitochondriales sévères et dans l'activation de l'apoptose et de la nécrose typiquement observés lors de la transition vers l'insuffisance.

Mots-clés : Hypertrophie, pore de perméabilité transitionnelle, cyclophiline-D, stress oxydatif, insuffisance cardiaque .

Abstract

Heart failure is associated with an increase in cell death, impairment of oxidative phosphorylation and release of pro-apoptotic factors by the mitochondria. Our previous studies have showed that mitochondrial vulnerability to permeability transition pore (PTP) opening in response to stress is an early phenomenon that takes place in the compensated hypertrophied heart before the development of any systolic or mitochondrial dysfunctions typically observed in the failing heart. The goal of the present study was to investigate the PTP regulatory mechanisms involved in this phenomenon. Heart hypertrophy was induced by an aorto-caval fistula (ACF) in WKHA rats and experiments were carried 12 weeks post-surgery at a stage known to correspond to compensated hypertrophy. Mitochondria were isolated from cardiac tissue. Ca^{2+} induced PTP opening, respiratory functions, reactive oxygen species (ROS), membrane potential ($\Delta\Psi$), endogenous Ca^{2+} matrix levels and the mitochondrial content and localisation (soluble vs membrane bound) of the regulatory protein cyclophilin-D (Cyp-D) were determined. Ca^{2+} levels required to induce PTP opening was significantly lower in ACF compared to sham (95 ± 12 nmol Ca^{2+} et 145 ± 11 nmol Ca^{2+} respectively, $n=7$, $P < 0.01$), and this in absence of any basal respiratory dysfunctions. This effect persisted in the presence of cyclosporine A (CsA), a partial PTP inhibitor that prevents Cyp-D binding to the mitochondrial inner membrane. Total expression of Cyp-D as well as the ratio of membrane/soluble was superior in the ACF compared to the sham group (1.8 ± 0.1 folds, $P < 0.001$ and 3.7 ± 0.8 folds, $P < 0.01$ higher in ACF animals compared to their sham counterparts). This increased binding of Cyp-D, which is known to facilitate PTP opening, was not reversed by incubation with high levels of CsA *in vitro*. This phenomenon was accompanied by an increased ROS production and to a lesser degree increased matrix Ca^{2+} levels, two factors that could explain the higher levels of bound Cyp-D in ACF vs sham. Together these results suggest that early modifications of key PTP regulators, including an increase in Cyp-D expression and membrane recruitment, contribute to the development of mitochondrial vulnerability in the

hypertrophied heart. Those initial changes may play a role in the development of severe mitochondrial dysfunctions and activation of apoptosis and necrosis typically observed during the transition to heart failure.

Keywords : Hypertrophy, permeability transition pore, cyclophilin-D, oxidative stress, heart failure

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I Revue de la littérature.....	5
Rôles des mitochondries dans la vie et la mort cellulaires.....	6
Production d'ATP par la phosphorylation oxydative.....	6
Production d'espèces réactives de l'oxygène.....	8
Mort cellulaire.....	9
Mécanismes de perméabilité des membranes mitochondriales.....	13
Structure du PTP.....	18
Régulation du PTP.....	19
Le Ca^{2+} : principal inducteur du PTP.....	19
La Cyclophiline-D : sensibilisatrice et composante du PTP.....	20
Espèces réactives de l'oxygène : un inducteur du PTP.....	27
Autres régulateurs du PTP.....	29
Rôles des mitochondries dans le remodelage hypertrophique ventriculaire pathologique et dans l'insuffisance cardiaque.....	31
Introduction.....	31
Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans le cœur insuffisant.....	32

Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans la phase d'hypertrophie compensée	38
Activation des mécanismes mitochondriaux de mort cellulaire dans le cœur insuffisant	45
La vulnérabilité au stress : un contributeur potentiel dans la transition vers l'insuffisance cardiaque	49
Bibliographie.....	63
CHAPITRE II L'article de recherche dans sa version intégrale	78
Auteurs et leur contribution à l'étude.....	79
Compensated cardiac hypertrophy is associated with increased cyclophilin-d binding and vulnerability to permeability transition pore opening.....	81
Abstract	82
Introduction	83
Methods.....	85
Results	91
Discussion	96
Conclusion	101
Acknowledgements.....	103
References	104
Figure legends	113
Figures.....	116

Liste des tableaux

Tableau 1 : Régulateurs du PTP et leur effet sur la probabilité de son ouverture.	30
Tableau 2 : Activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients humains atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques.	35
Tableau 3 : Les résultats représentent la moyenne \pm S.E.M. de 9 expériences par groupe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ groupe CAL vs groupe sham.	36

Liste des figures

Figure 1 : La phosphorylation oxydative.	7
Figure 2 : La voie extrinsèque et la voie intrinsèque de la mort cellulaire.....	11
Figure 3 : Représentation schématique du recrutement de la voie intrinsèque par la voie extrinsèque.....	15
Figure 4 : Schéma du mécanisme pro-apoptotique du PTP.....	16
Figure 5 : Schéma du mécanisme du PTP et sa régulation par la cyclophiline-D.	22
Figure 6 : Gonflement de mitochondries cardiaques provenant de souris Ppif^{-/-}, Ppif^{+/-} et Ppif^{+/+} induit par 250uM Ca²⁺.....	23
Figure 7 : Augmentation de l'expression de la cyclophiline-D membranaire en réponse à un stress oxydatif induit par le t-butyl hydroperoxide (tBH).....	26
Figure 8 : Accumulation d'espèces réactionnelles de l'oxygène et l'induction de du PTP.....	28
Figure 9 : Morphologie des cardiomyocytes et des mitochondries dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par le TNFα.	33
Figure 10 : Production de radicaux libres par des particules mitochondriales isolées à partir des cœurs normaux et insuffisants.....	37

Figure 11 : Fonction respiratoire mesurée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs en phase d'hypertrophie compensée et d'insuffisance.	40
Figure 12 : Propriétés respiratoires de mitochondries isolées à partir de cœurs normaux ou en stade d'hypertrophie compensée à la suite d'une constriction de l'aorte abdominale.	42
Figure 13 : Effet de l'hypertrophie cardiaque sur la respiration mitochondriale lors d'une inhibition du complexe IV avec NO•.....	43
Figure 14 : Effet de l'hypertrophie cardiaque sur l'expression de la NO synthase.....	44
Figure 15 : La perte de cyclophiline-D (Ppif-/-) dans les souris sur-exprimant la sous-unité β2a des canaux calciques de type L du sarcolème (DGT).....	48
Figure 16 : Effet du remodelage ventriculaire hypertrophique sur la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress <i>in vitro</i>.	50
Figure 17 : Effet de la surcharge volumique sur la fonction basale des mitochondries cardiaques.....	54
Figure 18 : Effet de la surcharge volumique sur la dysfonction respiratoire induite par une anoxie-réoxygénation <i>in vitro</i>.....	55
Figure 19 : Effet de la surcharge volumique sur la vulnérabilité à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique.....	57

Figure 20 : Relâche de la lactate déshydrogénase (LDH) et la séquestration mitochondriale du 3H-DOG mesurées dans les groupes contrôles et ACF. 59

Figure 21 : Réponse du myocarde à un stress d'ischémie-reperfusion ex vivo chez des animaux contrôles et ACF. 61

Abréviations

ACF = Fistule aorto-cavale

ADN = Acide désoxyribonucléique

ADP = Adénine di-phosphate

AIF = Facteur d'induction de l'apoptose

AMP = Adénine monophosphate

ANT = Translocateur des nucléotides adénylés

Apaf = Apoptotic protease-activating factor-1

ARNm = Acide ribonucléique messenger

ATP = Adénosine triphosphate

Bad = Bcl_{XL}/Bcl-2 associated death promoter homolog

Bak = Bcl-2 antagonist killer

Bax = Bcl-2 associated X protein

Bcl-2 = B-cell lymphoma 2

Bcl_{XL} = Longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development

Bid = BH3 interacting death domain agonist

Bim = Bcl-2 interacting mediator of cell death

Bmf = Bcl-2 modifying factor

BNip3 ou NIX = Bcl-2 adenovirus alb 19kd interacting protein 3

BSA = Albumine de sérum bovin

Ca²⁺ = Ion calcium

Caspase = Cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases

CS = Citrate synthase

CsA = Cyclosporine A

Cyp-D = Cyclophiline-D

Cyt-c = Cytochrome c

Da = Dalton

Δp = Force proton motrice

ΔpH = Gradient de pH
 $\Delta\Psi$ = Potentiel de membrane
DISC = Death-inducing signaling complex
DOG = Déoxyglucose
EGTA = Éthylène glycol bis(2-aminoéthyl ether)-N,N,N',N'-acide tétraacétique
EndoG = Endonucléase G
eNOS = Oxyde nitrique synthase endothéliale
 F_1F_0 -ATPase = ATPase ou complexe V
FAD = Flavine-adénine dinucléotide (forme oxydée)
FADD = Fas-associated via death domain
 FADH_2 = Flavine-adénine dinucléotide (forme réduite)
 H^+ = Protons
 ^3H -DOG = Déoxyglucose tritié
 H_2O_2 = Peroxyde d'hydrogène
IAP = Inhibitor of apoptosis proteins
iNOS = Oxyde nitrique synthase inductible
I-R = Ischémie-reperfusion
LDH = Lactate déshydrogénase
LVDP = Pression développée par le ventricule gauche
MAC = Canal inducteur de l'apoptose via la mitochondrie
MEM = Membrane externe mitochondriale
MIM = Membrane interne mitochondriale
MnSOD = Super oxyde dismutase manganèse dépendante
MV-4-Cs = N-méthyl-valine-CsA
 NAD^+ = Nicotinamide-adénine dinucléotide (forme oxydée)
NADH = Nicotinamide-adénine dinucléotide (forme réduite)
 $\text{NADH} + \text{H}^+$ = Nicotinamide-adénine dinucléotide (forme réduite)
NADPH = Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NHE = Échangeur sodium-hydrogène

NIX = NFkB inducteur kinase

NO = Oxyde nitrique

NOS = Oxyde nitrique synthase

$\frac{1}{2}O_2$ = Oxygène moléculaire

$O_2^{\bullet -}$ = Anion superoxyde

OMIHtrA2 = High temperature requirement protein A2

PCr = Phospho-créatine

Pi = Phosphate inorganique

PTP = Pore de perméabilité transitionnelle

PUMA = p53-upregulated modulator of apoptosis

RCR = Ratio de contrôle respiratoire

ROS = Espèces réactives de l'oxygène

SD = Sprague-Dawley

SfA = Sangliféhrine A

SHR = Rat spontanément hypertendu

Sham = Animal contrôle ou animal avec chirurgie simulée

Smac/DIABLO = Second mitochondria-derived activator of caspases-direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pi

SOD = Superoxyde dismutase

tBH = t-butyl hydroperoxide

tBid = Bid activée

TNF α = Facteur de nécrose tumoral α

TUNEL = Terminal deoxyribonucleotyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling

VDAC = Canal anionique voltage dependant

VOL = Surcharge volumique

WKHA = Wistar-Kyoto hyperactif

XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis protein

Remerciements

Je débute en remerciant mon directeur de recherche Dr. Yan Burelle qui m'a accepté dans son laboratoire et qui m'a guidé tout au long de mes études supérieures. L'encadrement exemplaire et la grande maturité de M. Burelle m'ont permis d'évoluer dans mes apprentissages et dans mes activités de recherche à un rythme inespéré.

Je tiens à remercier Alexis Ascah pour m'avoir aidé à acquérir les connaissances et les compétences nécessaires pour accomplir mes manipulations de laboratoire. Merci Alexis pour ta générosité et pour l'atmosphère de travail que tu amènes dans le laboratoire. Je remercie également mes collègues de laboratoires, Mariannick Marcil, Kristina Csukly et Tien Sing Young Nicholas pour leur aide et pour leur générosité.

Je remercie mes parents pour m'avoir appris les choses de la vie qui ne s'apprennent pas à l'école ainsi que pour m'avoir supporté dans mes décisions.

Merci Geneviève pour ton support, tes encouragements et pour me donner la force de caractère nécessaire pour passer à travers certains obstacles rencontrés dans mes études et dans la vie.

Je termine avec une blague philosophique de John Lowry Dobson, une personne qui m'inspire et qui stimule mon appréciation pour les merveilles de la vie. *Des scientifiques prétendent être capable de créer la vie. Dieu est curieux alors les scientifiques l'amènent dans leur laboratoire. Les scientifiques débutent en disant «D'abord nous prenons de la terre...» Dieu s'exclame «Faites votre propre terre!»* (Adapté de telescopepictures.com).

INTRODUCTION

Les mitochondries sont des organelles surtout reconnues pour leur participation à la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) via la chaîne respiratoire et l'oxydation phosphorylante. Elles sont impliquées dans le métabolisme des acides gras, dans la synthèse des acides aminés et dans l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) (17, 52, 113). Les mitochondries jouent également un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose et par nécrose. La régulation des fonctions de production d'énergie (ATP) et d'apoptose est essentielle au maintien du fonctionnement normal de la cellule et de l'organe. Cependant, lors d'une situation de stress aigu ou chronique, la régulation de ces fonctions peut être altérée entraînant la mort prématurée de la cellule.

La thématique générale du laboratoire de Yan Burelle porte sur la plasticité mitochondriale dans les myocytes du muscle squelettique et cardiaque lors de conditions physiologiques et pathologiques. Le laboratoire s'intéresse particulièrement au pore de perméabilité transitionnelle (PTP) mitochondrial, un pore non spécifique à haute conductance de la membrane interne qui est composé d'un complexe protéique dont la structure n'est pas encore élucidée. Il est généralement accepté que l'ouverture du PTP constitue un mécanisme important dans le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose et par nécrose dans plusieurs types de tissus (33, 65, 167).

L'étude présentée dans ce mémoire porte sur le développement de la vulnérabilité mitochondriale lors du remodelage ventriculaire hypertrophique menant à l'insuffisance cardiaque. Plusieurs études chez l'homme et chez les animaux ont démontré que lors de l'insuffisance cardiaque les mitochondries présentent des altérations structurales, une diminution de la capacité oxydative et une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par la chaîne respiratoire (24, 86, 148, 164). Il a également été démontré que les mitochondries participent à l'activation de la mort cellulaire par la

relâche de facteurs pro-apoptotiques lors de l'insuffisance cardiaque (39, 140, 159). La grande majorité de ces études ont été menées sur des cœurs insuffisants dans la phase finale de la maladie. Or, l'information disponible à ce jour ne permet pas d'établir si les dysfonctions mitochondriales observées apparaissent de manière précoce et contribuent au développement de la pathologie ou si elles surviennent en conséquence à l'insuffisance cardiaque en phase terminale.

Notre laboratoire a entrepris des travaux visant à identifier les modifications mitochondriales au cours de la phase compensée de l'hypertrophie cardiaque. Nous avons utilisé un modèle de surcharge volumique (VOL) induit par fistule aorto-cavale (ACF) chez le rat WKHA (une souche de rats consanguins affichant une susceptibilité au remodelage induit par VOL). Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont été menées douze semaines post-chirurgie, alors que les rats affichaient des symptômes associés à la phase compensée de l'hypertrophie pathologique. Les mitochondries isolées des cœurs VOL ont présenté des fonctions de base (respiration et potentiel de membrane) identique au groupe témoin (sham) (114). Toutefois, lorsque soumises à un stress d'anoxie-réoxygénation, les mitochondries de cœurs VOL ont montré une récupération inférieure à celle des cœurs témoins. Cette différence a été abolie par l'ajout de cyclosporine A un inhibiteur du PTP. L'induction du PTP par surcharge calcique a également révélé une vulnérabilité des mitochondries des cœurs VOL au stress aigu (le calcium étant un puissant inducteur du PTP). Dans une autre série d'expériences, nous avons soumis des cœurs entiers à un stress d'ischémie-reperfusion et l'ouverture du PTP a été quantifiée en utilisant la technique de séquestration mitochondriale du déoxyglucose tritié (^3H -DOG) (26, 62, 114). Les résultats ont montré que comparativement aux témoins, une plus grande quantité de ^3H -DOG a pénétré dans les mitochondries de cœurs VOL, indiquant une ouverture accrue du PTP. Ce phénomène était associé à une plus grande dysfonction contractile et à un plus grand dommage tissulaire en reperfusion dans les cœurs VOL (114). Ces résultats suggèrent que les mitochondries

développent une vulnérabilité au stress tôt dans la pathologie, ce qui pourrait contribuer à l'activation de la mort cellulaire lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque.

Suite à ces résultats nous avons investigué les mécanismes potentiels augmentant la sensibilité du PTP au stress au cours du remodelage ventriculaire pathologique. Nous avons donc posé l'hypothèse que pendant la phase compensée de l'hypertrophie pathologique, une modification au niveau de certains régulateurs clés du PTP contribue à ce phénomène. Le PTP est régulé de manière complexe par de nombreux effecteurs dont certains d'entre eux sont associés au remodelage ventriculaire et à l'insuffisance cardiaque. Un des mécanismes à l'étude dans ce mémoire était lié à la concentration et à la localisation de la protéine régulatrice du PTP, la cyclophiline-D (CyP-D). La CyP-D est une protéine normalement soluble dans la matrice mitochondriale et sa liaison à la membrane interne mitochondriale augmenterait l'occurrence d'ouverture du PTP (30, 127, 155). Nous avons donc mesuré la quantité totale de CyP-D ainsi que la quantité de la protéine liée aux membranes mitochondriales chez des animaux VOL et témoins. Comme il a été démontré que la Cyp-D soluble se lie aux membranes mitochondriales en réponse à un stress oxydatif (30), nous avons mesuré la production de ROS produites par la chaîne respiratoire. Nous avons également mesuré la concentration de Ca^{2+} mitochondriale puisque, comme les ROS, le Ca^{2+} est reconnu pour être un puissant activateur du PTP.

Les résultats obtenus lors de la présente étude confirment que lors du développement de la pathologie, des modifications surviennent au niveau des régulateurs du PTP de manière à favoriser son ouverture lors des situations de stress. Les résultats suggèrent que, pendant la phase compensée de l'hypertrophie cardiaque, les mitochondries développent une vulnérabilité au stress aigu et suggèrent que ce phénomène pourrait contribuer à la transition vers l'insuffisance cardiaque. D'autres études sont nécessaires afin

d'évaluer si les dysfonctions et les modifications mitochondriales observées peuvent être prévenues par un traitement pharmacologique ou par l'exercice physique.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, une revue de la littérature est présentée en trois parties. La première partie traite du rôle des mitochondries dans la vie et dans la mort cellulaire par les mécanismes de synthèse d'ATP et de perméabilité des membranes mitochondriales respectivement. Dans la deuxième partie, le PTP, un des mécanismes de perméabilité membranaire, et ses régulateurs sont décrits. Compte tenu du travail de recherche effectué dans ce mémoire, un accent particulier est porté sur les régulateurs étudiés comme mécanisme de sensibilisation du PTP dans la phase compensée de l'hypertrophie cardiaque. La troisième partie présente les modifications des fonctions et de la structure des mitochondries survenant lors des phases d'hypertrophie compensée et décompensée. Les mécanismes mitochondriaux de la mort cellulaire dans le cœur insuffisant et le développement de la vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP sont également abordés.

Le deuxième chapitre comporte l'article de recherche qui découle des travaux de la présente étude. Ce manuscrit est présenté dans sa forme intégrale anglaise tel qu'il sera soumis pour publication.

CHAPITRE I

Revue de littérature

Rôles des mitochondries dans la vie et la mort cellulaires

Production d'ATP par la phosphorylation oxydative

Les mitochondries sont surtout connues pour leur rôle dans la production d'énergie, produite sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP). Les cardiomyocytes sont les cellules qui contiennent la plus grande concentration de mitochondries. Elles occupent de 30 à 40% du volume des cardiomyocytes et produisent environ 90% de l'ATP cellulaire (92, 138).

La compréhension actuelle des mécanismes de synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative est basée sur la théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (15, 122). La théorie suggère qu'une série de complexes enzymatiques situés dans la membrane interne mitochondriale (MIM), formant la chaîne respiratoire, sert à établir un gradient de protons entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale (Figure 1). C'est ce potentiel électrochimique qui sert de force motrice pour la synthèse d'ATP.

La chaîne respiratoire, ou chaîne de transport des électrons, est composée de quatre complexes enzymatiques (complexe I à IV) et de deux transporteurs d'électrons (coenzyme Q et cytochrome c) (Figure 1). Les complexes I à IV forment un système d'oxydo-réduction qui est couplé à la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) produisant de l'ATP au niveau d'un cinquième complexe (Figure 1).

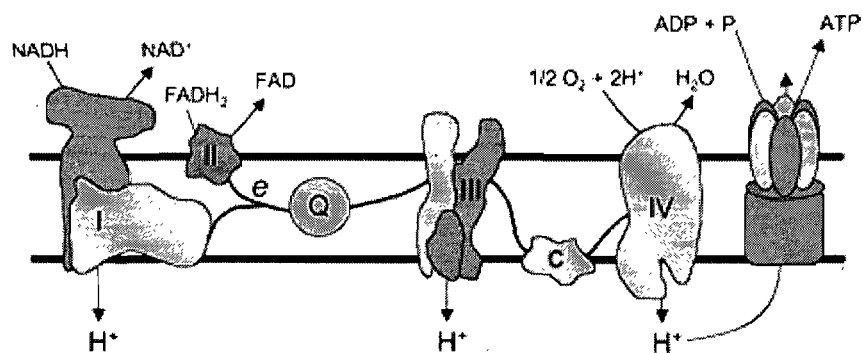


Figure 1 : La phosphorylation oxydative. L'énergie dégagée par les réactions d'oxydo-réduction s'opérant au niveau des divers complexes de la chaîne respiratoire est utilisée pour pomper des protons (H^+) vers l'espace intermembranaire, ce qui génère la force protons motrice (Δp) utilisée par le complexe V (ATP synthase) pour resynthétiser l'ATP à partir de H^+ , d'ADP et de P_i .

Production d'espèces réactives de l'oxygène

La chaîne de transport des électrons de la mitochondrie est une source majeure de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau de la cellule. Il est relativement bien reconnu que les complexes I et III sont les principaux sites responsables de cette production (48, 145).

Dans des conditions physiologiques normales, la chaîne respiratoire génère de faibles quantités d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) facilement neutralisées par le superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) (24). Dans ces circonstances on estime que jusqu'à 2% de la consommation d'oxygène est convertie en $O_2^{\bullet-}$ (24, 57). L'organisme possède un certain nombre d'enzymes, comme le MnSOD, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase qui sont capables de détruire les radicaux libres produit en excès. Cependant, lors de conditions pathologiques, il est possible que des dommages aux niveaux des complexes respiratoires ou des modifications du potentiel de membrane ou de l'état rédox résultent en une augmentation substantielle de la production d' $O_2^{\bullet-}$ (24). Les ROS causent la dénaturation (introduction d'un groupement carbonyle C=O) et/ou la fragmentation des protéines et des acides nucléiques ainsi que la peroxydation des lipides. Dans ce dernier cas les ROS entraînent une altération du fonctionnement des membranes et des dépôts de lipides oxydés. En présence de traces métalliques les ROS causent l'oxydation du glucose avec une libération d' H_2O_2 et d' OH^{\bullet} engendrant des clivages et des mutations de l'ADN. Tel qu'il sera abordé plus loin, quelques études ont démontré que dans le cœur insuffisant, la production de radicaux libres mitochondriales est augmentée et constitue une source significative de dommage (24).

Mort cellulaire

Les mitochondries jouent un rôle important dans la mort cellulaire par nécrose ainsi que par apoptose (39, 157). La nécrose est considérée comme une forme de mort cellulaire plus ou moins organisée. Elle est plutôt associée à un stress aigu ou traumatique lors de dommage physique ou chimique comme par exemple lors de l'ischémie-reperfusion (8, 159). La mort cellulaire nécrotique se caractérise par une perte rapide de l'intégrité de la membrane cellulaire, généralement secondaire à une perte de l'équilibre ionique et à un œdème cellulaire. La fuite du contenu cellulaire dans l'environnement provoque une réponse inflammatoire, ce qui distingue cette forme de mort des autres (133). Bien qu'il ait longtemps été présumé que la nécrose était la seule forme de mort dans le cœur mature, plusieurs études ont démontré que l'apoptose peut être activée dans les cardiomyocytes différenciés en conditions pathologiques (8, 90, 140, 165).

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée qui est impliqué dans le développement, dans l'entretien et dans la défense de l'organisme. L'apoptose sert par exemple à débarrasser les cellules produites en excès lors de l'embryogenèse et lors de la formation des tissus comme les chambres du myocarde (94, 161). Sur une base quotidienne l'apoptose sert à compenser pour la naissance de nouvelles cellules générées par mitose. Cette forme de mort cellulaire constitue également un mécanisme d'élimination des cellules devenues nuisibles pour l'organe. Cependant, un dérèglement engendrant des fonctions apoptotiques insuffisantes ou excessives peuvent entraîner des conditions pathologiques comme le développement des tumeurs cancéreuses ou la mort de cardiomyocytes lors de l'insuffisance cardiaque (8, 90).

Morphologiquement l'apoptose est caractérisée par un rétrécissement de la cellule, par la condensation de la chromatine et par la fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (8). Les membranes sont ensuite insérées dans des vésicules qui sont phagocytées par les cellules environnantes. Contrairement à la nécrose, le processus apoptotique nécessite un maintien de la production d'énergie et ne provoque pas d'inflammation (8, 41).

Il existe deux principales voies de signalisation menant à l'exécution de la mort cellulaire : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, qui sont illustrées sommairement à la figure 2. Ces deux voies activent une série de protéases, les caspases (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases), qui dégradent plusieurs composantes cellulaires incluant des protéines structurales, des protéines régulatrices et des enzymes de réparation de l'ADN (8). La voie de signalisation extrinsèque est activée par la liaison d'un ligand à son récepteur (TNF, Fas) situé sur la surface de la membrane plasmique (Figure 2) (8, 39, 90). La liaison du ligand entraîne un changement de conformation de son récepteur, ce qui recrute la molécule adaptatrice FADD (Fas-associated via death domain) (39, 134, 159). Cette interaction initie la formation du DISC (death-inducing signaling complex) permettant la dimérisation et l'activation de pro-caspase 8 et 10. La pro-caspase 8 activée (caspase 8) clive et active la protéine exécutive pro-caspase 3 (caspase 3). La caspase 8 active également par clivage la protéine Bid (BH3 interacting death domain agonist). Bid activée (tBid) recrute la voie intrinsèque en interagissant directement avec la MEM mitochondriale (8, 39, 94, 137, 159).

La mitochondrie est au cœur de la voie intrinsèque de la mort cellulaire (Figure 2). L'organelle peut relâcher certaines protéines, qui une fois dans le cytoplasme, participent aux processus de mort cellulaire. Une de ces protéines est le cytochrome c (Cyt-c). En réponse à un stimulus apoptotique, la mitochondrie relâche le Cyt-c qui participe à

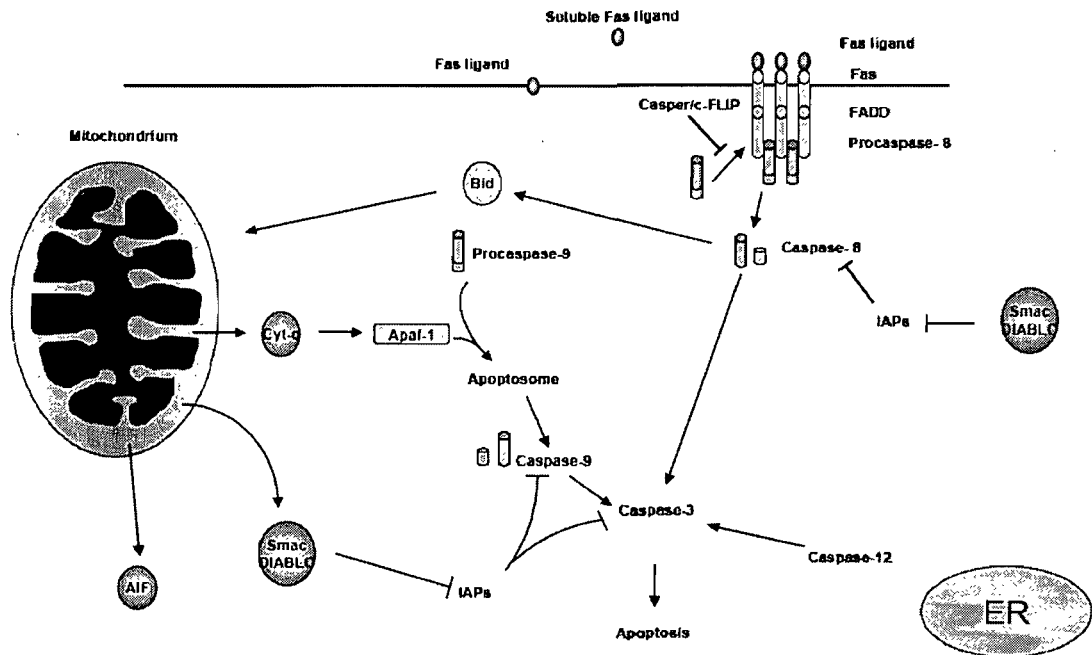


Figure 2 : La voie extrinsèque et la voie intrinsèque de la mort cellulaire. L'activation de la voie extrinsèque sollicite la voie mitochondriale, qui participe à la mort de la cellule par la relâche de plusieurs facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Adaptée de van Empel et al. (159).

l'assemblage de l'apoptosome dans le cytoplasme. L'apoptosome est un complexe enzymatique formé par sept molécules d'Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), sept molécules de dATP, 14 molécules de Cyt-c et de sept pro-caspases 9 (41, 88, 134). L'apoptosome et les caspases 9 forment un holoenzyme qui active des caspases exécutrices (caspases 3 et 7) (104) menant à la mort cellulaire (88).

La cellule possède des mécanismes prévenant l'activation accidentelle de la pro-caspase 9 lors des conditions normales. Le Cyt-c est codé par un gène nucléaire et synthétisé dans les ribosomes du cytoplasme sous une forme immature appelée apo cytochrome c. La forme apo est privée d'un groupement heme qui est attribué à la protéine une fois importée dans la mitochondrie. Non seulement l'apo cytochrome c ne peut pas participer à la formation de l'apoptosome, mais il inhibe l'activation de caspase 9 (33, 118, 119). Un autre mécanisme prévenant l'activation fortuite de caspase 9 est assuré par une famille de protéines inhibitrices des caspases connue sous l'acronyme IAP (inhibitor of apoptosis proteins) (1, 23). Une des protéines de cette famille est la XIAP (provenant de l'anglais pour X-chromosome-linked IAP), inhibitrice de l'activité des caspases 3, 7 et 9 (134). Cependant, lorsque la voie intrinsèque est activée, la mitochondrie relâche les protéines Smac/DIABLO et OMI/HtrA2 qui neutralisent l'activité des IAP et particulièrement celle de XIAP (1, 23, 51, 76, 134, 137, 150, 158).

AIF (apoptosis-inducing factor) et endonucléase G (EndoG) sont des protéines qui sont également libérées par la mitochondrie au cours de la mort cellulaire (5, 158). Les mécanismes par lesquels ces facteurs pro-apoptotiques sont relâchés ne sont pas complètement compris, mais il semblerait être différents de ceux impliqués dans la relâche de Cyt-c, smac/DIABLO et OMI/HtrA2 (5, 158). Il a été rapporté qu'AIF et EndoG

migrent vers le noyau cellulaire et procèdent à la fragmentation de l'ADN et à la condensation de la chromatine, deux caractéristiques de l'apoptose (5, 89, 107, 153).

La voie intrinsèque peut être activée seule ou simultanément avec la voie extrinsèque (8, 39, 58). Suivant l'activation des récepteurs de la voie extrinsèque, tBid interagit avec la MEM et contribue à la perméabilisation des membranes mitochondriales et à la relâche subséquente des facteurs pro-apoptotiques (8, 39, 59, 94, 137, 159). Bid n'est toutefois pas la seule protéine régulant la perméabilité des membranes mitochondriales lors de la mort cellulaire. La prochaine section traite plus en détail de deux mécanismes régulateurs de la perméabilité membranaire mitochondriale documentés à ce jour, soit :

1. La régulation de la perméabilité membranaire par les protéines de la famille des Bcl-2.
2. La formation du pore de perméabilité transitionnelle mitochondriale (PTP), qui est le mécanisme à l'étude dans ce mémoire.

Mécanismes de perméabilité des membranes mitochondriales

La famille des protéines Bcl-2, identifiées originalement dans les lymphomes 2 humains (9, 94), est composée de protéines ayant des propriétés 1) anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl_{XL}) et 2) pro-apoptotiques (61, 94). Cette dernière catégorie est subdivisée en protéines pro-apoptotiques à domaines multiples (Bax et Bak) comportant les domaines BH1, BH2 et BH3 ou à domaines BH3 (Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma, BNip3 et Nix) (39, 61, 94). Le mécanisme central dans ce type de perméabilisation est le changement de conformation et l'activation des protéines Bax et Bak. Ce processus permet leur oligomérisation et leur insertion dans la MEM, menant à la perméabilisation et à la relâche

de facteurs pro-apoptotiques (Figure 3). Bax est normalement localisée dans le cytosol sous sa forme inactive et migre vers la mitochondrie en réponse à des stimuli apoptotiques (3, 143). Bak est présente dans la MEM sous sa forme inactive jusqu'au signal apoptotique. À titre d'exemple, l'activation de Bid lors d'un stress d'ischémie-reperfusion, cause l'oligomérisation de Bax, qui s'insère dans la MEM, ce qui forme des pores permettant la relâche de facteurs pro-apoptotiques (3, 39, 45, 134, 143) (Figures 3 et 4). Ce mécanisme semble être d'une importance considérable lors de l'apoptose, puisque les cellules de souris transgéniques n'exprimant pas les deux protéines (Bax et Bak) affichent une résistance accrue à la perméabilisation de la MEM en réponse à de nombreux stimuli apoptotiques (61, 146, 163). Par ailleurs, certaines protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 sembleraient être des activateurs de Bax et Bak alors que d'autres interféreraient l'action des protéines anti-apoptotiques (61, 106).

Un autre mécanisme de perméabilité des membranes mitochondriales est associé à l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (PTP). Le PTP est un pore non spécifique à haute conductance localisé dans la MIM. Le modèle du «pore» a été introduit à la fin des années 1970 par Hunter et Haworth (72, 73, 81, 82) suite à la constatation que le Ca^{2+} provoquait le gonflement de la matrice mitochondriale. Il est maintenant établi que l'ouverture du PTP induite par le Ca^{2+} provoque une augmentation soudaine de la perméabilité de la MIM aux solutés de <1500 Da (167). Dans cette situation, certaines protéines de la matrice mitochondriale sont incapables de diffuser à travers le pore, ce qui génère un gradient par pression oncotique et un gonflement mitochondrial (11). *In vitro*, l'expansion du volume de la matrice peut se poursuivre jusqu'à la rupture de la MEM (15, 33, 39, 167). Ceci est possible puisqu'une fois dépliée, la surface totale de la MIM est beaucoup plus grande que celle de la MEM (Figure 2). La rupture de la MEM permettrait la diffusion des protéines pro-apoptotiques (cytochrome c, smac/DIABLO et OMIHtrA2) normalement comprises dans l'espace inter-membranaire (61, 158). Il n'est toutefois pas

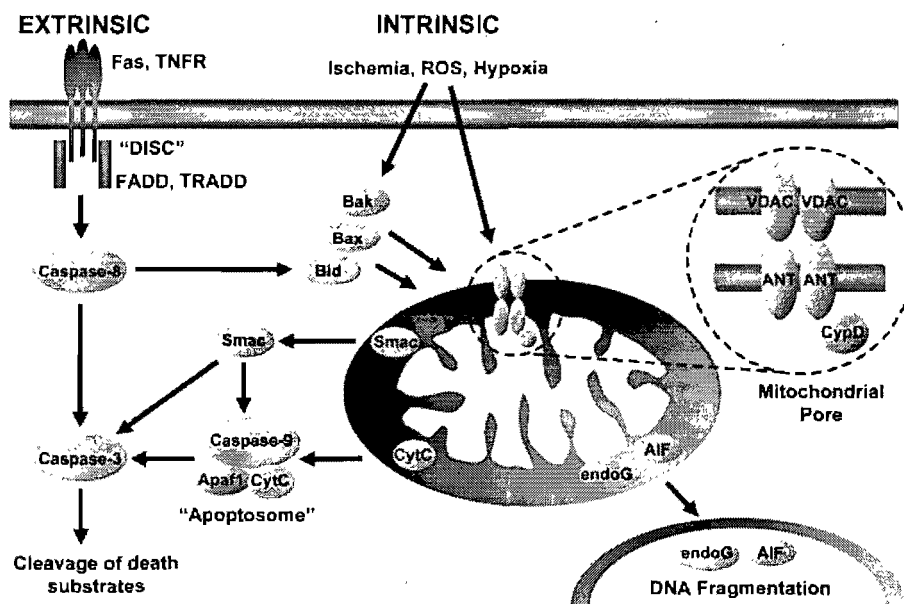


Figure 3 : Représentation schématique du recrutement de la voie intrinsèque par la voie extrinsèque. Les protéines de la famille des Bcl-2 et le pore de perméabilité transitionnelle régulent la perméabilité des membranes mitochondriales et la relâche de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie. Adapté de Baines et Molkenin (8).

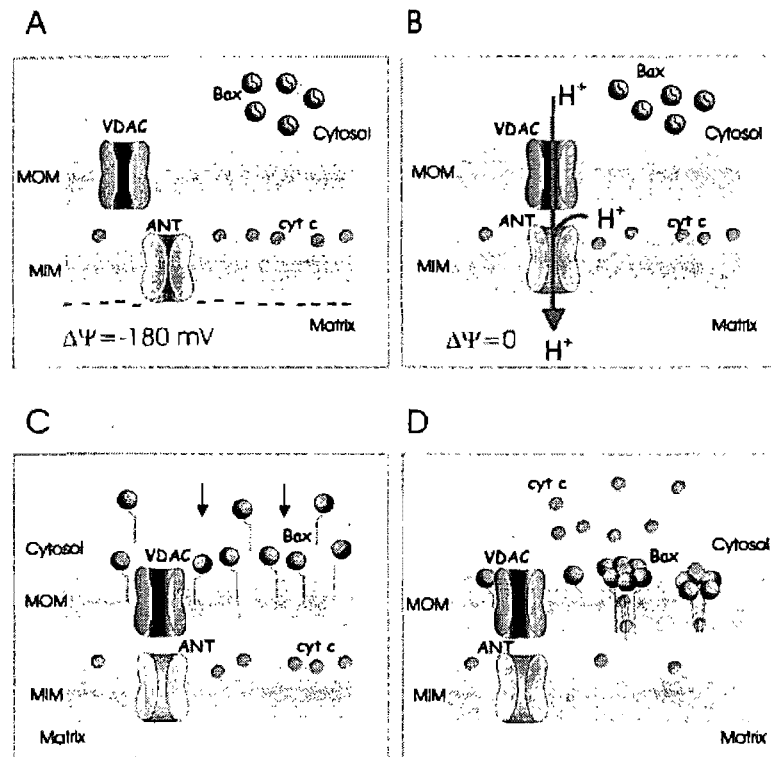


Figure 4 : Schéma du mécanisme pro-apoptotique du PTP. L'ouverture du PTP agit comme signal pour initier la translocation de Bax vers la mitochondrie. Adaptée de De Giorgi et al. (2002) (44).

établi si le gonflement mitochondrial peut atteindre le niveau nécessaire pour provoquer la rupture de la MEM dans des conditions *in vivo*.

L'ouverture prolongée du PTP permet une infiltration des H^+ dans la matrice, entraînant la chute du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) (dépolérisation) suivie par le découplage entre la chaîne de transport des électrons et l'oxydation phosphorylante. Dans cette situation, la chaîne respiratoire intacte consomme de l'oxygène à vitesse maximale alors que le complexe V (F_1F_0 -ATPase) consomme de l'ATP et pompe des H^+ vers l'espace intermembranaire pour tenter de maintenir le potentiel de membrane et d'éviter le gonflement mitochondrial (52). Dans de telles conditions, la cellule est condamnée à une mort par nécrose (8, 66, 87).

Le PTP peut également s'ouvrir d'une manière transitoire, ce qui permettrait de maintenir le potentiel de membrane et la production d'ATP ainsi que de participer à la relâche du cyt-c lors du processus d'apoptose (16, 33, 87, 132). En effet, certaines études ont démontré que l'ouverture transitoire du PTP constitue un signal qui initie la translocation et la multidimérisation de Bax (Figure 4) (18, 44, 131, 160). Par ailleurs, il s'avère également que Bax participe à la formation de pores dans la MEM permettant la relâche du cytochrome c indépendamment de l'ouverture du PTP (4, 45, 97). Il semblerait donc que les pores Bax et le PTP agissent de manière dépendante ou indépendante selon les circonstances (61).

Structure du PTP

Bien que sa structure ne soit pas encore élucidée, le PTP est souvent représenté schématiquement par le canal anionique à voltage dépendant (VDAC) dans la MEM, le translocateur des nucléotides adénylés (ANT) dans la MIM et la cyclophiline-D dans la matrice (Figure 3). Toutefois, des études menées sur des souris transgéniques ont récemment démontré que l'absence de VDAC dans les mitochondries ne retarde pas l'ouverture du PTP induit par le Ca^{2+} ou par un stress oxydant (7, 103). Ces résultats suggèrent que VDAC ne joue pas un rôle important dans la régulation du PTP.

Par ailleurs, il a été suggéré par de nombreuses études que l'ANT pourrait être une composante du PTP puisque des ligands de l'ANT, notamment l'atractyloside, la carboxyatractyloside, l'acide bongkrelic et l'ADP, influencent également le PTP (38, 69, 167). Cependant, une étude menée sur des souris transgéniques a démontré que la quantité de Ca^{2+} nécessaire pour induire l'ouverture du PTP est d'environ trois fois plus élevée dans les mitochondries d'hépatocytes d'animaux ANT-déficients comparativement à ceux d'animaux de souche sauvage (99). De plus, les hépatocytes ANT-déficients demeurent sensibles à une variété d'inducteurs de la mort cellulaire. Collectivement, les résultats de ces études suggèrent que l'ANT joue un rôle important dans la régulation du PTP sans toutefois être une composante essentielle dans la structure du pore (87, 99). Il a notamment été suggéré que l'ANT était le site de liaison de la protéine régulatrice cyclophiline-D (38, 166). Le rôle de la cyclophiline-D relatif au PTP est décrit plus loin dans la section *Cyclophiline-D : sensibilisatrice et composante du PTP*.

Il semble que plusieurs autres protéines (hexokinase, peripheral benzodiazepine receptor, Bax, complex I et possiblement d'autres) seraient impliquées à la fois dans la

structure et dans la régulation du PTP, mais il existe à ce jour peu d'informations sur leurs rôles pour parvenir à des conclusions satisfaisantes (11, 16, 74, 87).

Régulation du PTP

Malgré que la structure du PTP ne soit pas connue, il existe une quantité importante d'informations sur les mécanismes participant à sa régulation.

Le Ca^{2+} : principal inducteur du PTP

La mitochondrie joue un rôle majeur dans l'homéostasie du Ca^{2+} . Elle est dotée de systèmes de transports dépendants de la force proton motrice qui permettent l'entrée et la sortie du Ca^{2+} et ainsi, la régulation fine de la concentration mitochondriale en Ca^{2+} (33, 52). En conditions physiologiques, le Ca^{2+} régule l'activité de plusieurs enzymes métaboliques, incluant des enzymes du cycle de Krebs (pyruvate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase et 2-oxoglutarate déshydrogénase) ainsi que le complexe IV de la chaîne respiratoire (69). Il a été démontré que la concentration matricielle de Ca^{2+} oscille à chaque battement cardiaque, s'élevant en systole à la suite de la relâche de Ca^{2+} par le reticulum sarcoplasmique, puis diminuant en diastole (135). Ceci permet un couplage serré entre la consommation et la production cellulaire d'ATP (15, 33). Toutefois, dans certaines conditions pathologiques des dérèglements de l'homéostasie calcique menant à l'accumulation de Ca^{2+} au niveau de la matrice prédisposent à l'ouverture du PTP (15, 33, 52).

Il est bien établi que le Ca^{2+} mitochondrial en présence de phosphate inorganique (Pi) est le principal inducteur du PTP (33, 52, 167). L'ouverture du PTP induite par le Ca^{2+} peut être renversée par l'ajout en excès d'un chélateur de Ca^{2+} comme l'éthylène glycol bis (2-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-acide tétraacétique (EGTA) (75, 167). De plus, l'inhibition de l'unipore calcique par le rouge de ruthénium prévient l'ouverture du PTP lorsque les mitochondries sont exposées momentanément à de hautes concentrations de Ca^{2+} (52, 167).

Il est maintenant bien connu que l'ouverture du PTP induite par une surcharge en Ca^{2+} est grandement retardée lorsque les mitochondries sont pré-incubées en présence de cyclosporine A (CsA), (10, 15, 33, 37, 65, 167). La CsA est un composé immunosuppresseur utilisé pour le traitement du rejet de greffe post-transplantation et qui inhibe l'activité enzymatique d'une protéine clé impliquée dans la régulation du PTP, la cyclophiline-D (Cyp-D) (6, 10, 37, 87, 166). Il est important de noter que la CsA inhibe également l'activité de la calcineurine, une phosphatase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante cytosolique, qui peut-être impliquée dans la mort cellulaire. Toutefois, plusieurs études suggèrent que l'effet inhibiteur de la CsA sur le PTP est calcineurine-indépendante puisque des analogues de la CsA comme le NIM811 ou la sanglifehrine A procurent une inhibition du PTP sans influencer l'activité de la calcineurine (27, 87, 127, 162).

La Cyclophiline-D : sensibilisatrice et composante du PTP

La protéine soluble cyclophiline-D (Cyp-D) possède une activité péptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIase) et réside normalement dans la matrice mitochondriale (29, 33, 87). Dans les années 1990 le rôle de la Cyp-D dans la structure même du PTP a été suggéré suite à la constatation qu'une quantité similaire de CsA (approximativement 50pmol/mg de

protéine mitochondriale) était requise pour inhiber le PTP (Figure 5) ainsi que l'activité PPIase de la protéine (29, 33, 68, 87).

Récemment, des études menées sur des souris, dont le gène précurseur *Ppif* codant pour la Cyp-D a été supprimé (*Ppif*^{-/-}), ont démontré que les mitochondries de cœur, de foie et de cerveau affichent une résistance significative au gonflement mitochondrial induit par le Ca²⁺ comparativement aux mitochondries de souris de souche sauvage (*Ppif*^{+/+}) (Figure 6) (6, 10).

Les résultats de cette étude ont également montré que la CsA n'avait pas d'effet sur le PTP des mitochondries de souris *Ppif*^{-/-}, ce qui confirme que ce désensibilisateur du PTP agit via la Cyp-D (6, 10). Cependant, le PTP parvient à s'ouvrir à hautes concentrations de Ca²⁺ (~2 fois plus élevée) dans les mitochondries de souris *Ppif*^{-/-}. Cet effet est comparable à l'action de désensibilisation et non d'inhibition du PTP par la CsA (6, 33, 37, 75). De plus, les cellules des souris *Ppif*^{-/-} sont grandement protégées contre la mort cellulaire induite par un stress oxydatif. À l'opposé, les cellules d'animaux ayant une surexpression cardio-spécifique de la Cyp-D affichent une vulnérabilité accrue à l'ouverture du PTP dans ces mêmes conditions (6). En somme, ces études ont révélé trois points importants sur la régulation du PTP : 1) la Cyp-D joue un rôle important dans la régulation du PTP sans toutefois être essentielle à son ouverture, 2) la Cyp-D régule la sensibilité du PTP au Ca²⁺, 3) la CsA désensibilise le PTP en agissant sur la Cyp-D (6, 10).

Les données obtenues sur la souris *Ppif*^{-/-} sont compatibles avec certaines observations physiologiques. Ainsi, Eliseev et al. (55) ont comparé le niveau d'expression de la Cyp-D dans les mitochondries de différents tissus (cerveau, cœur et foie) chez le Rat

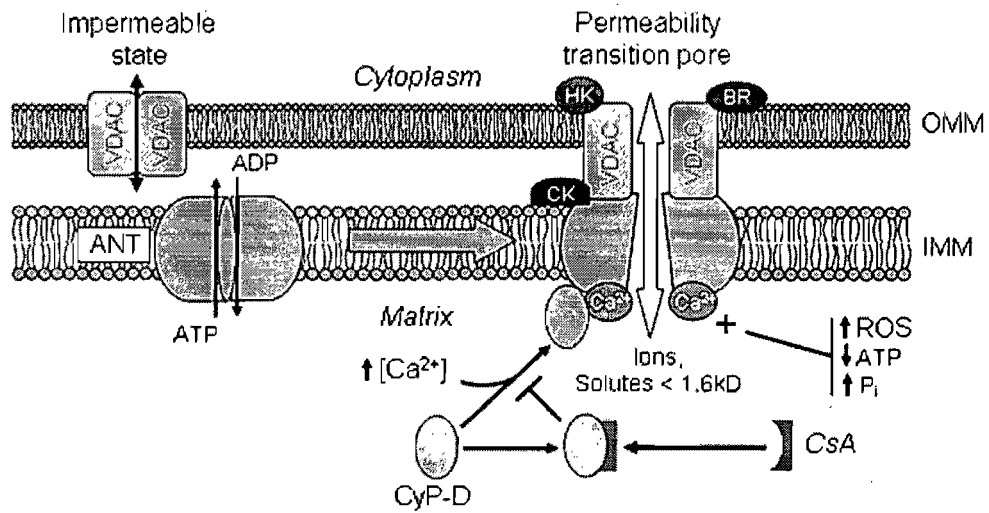


Figure 5 : Schéma du mécanisme du PTP et sa régulation par la cyclophiline-D. Lors d'une situation de stress, la cyclophiline-D se lie à la membrane interne mitochondriale, ce qui augmente la probabilité de l'ouverture du PTP. L'administration de CsA inhibe l'activité PPIase de la cyclophiline-D l'empêchant de se lier au pore et de participer à son ouverture. Adaptée de Javadov et Karmazyn (87).

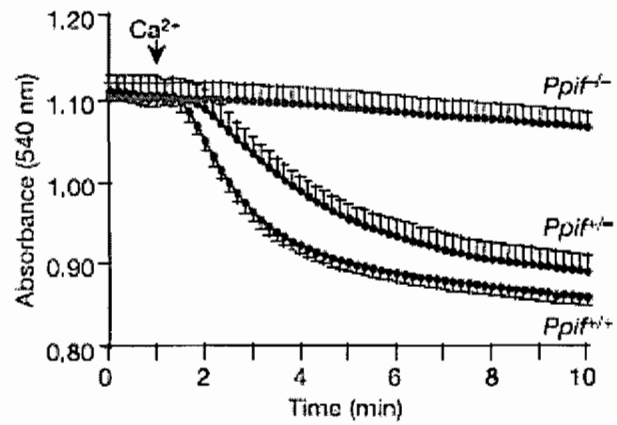


Figure 6 : Gonflement de mitochondries cardiaques provenant de souris Ppif^{-/-}, Ppif^{+/-} et Ppif^{+/+} induit par 250uM Ca²⁺. Les mitochondries de souris Ppif^{-/-} affichent une résistance accrue à l'ouverture du PTP comparativement aux mitochondries de souris normales (Ppif^{+/+}) ou hétérozygotes (Ppif^{+/-}). Adaptée de Baines et al. (6).

et les résultats montrent que plus l'expression de la protéine est élevée dans un tissu, plus les mitochondries sont sensibles à l'ouverture du PTP (55). De manière similaire, dans le cerveau, les mitochondries des neurones corticales et striatales expriment des quantités différentes de Cyp-D et ceci est corrélé avec leur sensibilité à l'ouverture du pore (21). Il semble également que dans les neurones l'expression de la Cyp-D varie au cours du développement. En effet, les neurones néonataux expriment significativement plus de Cyp-D et sont plus vulnérables à l'ouverture du PTP que les neurones adultes (55). Les auteurs de cette étude ont suggéré que la diminution de l'expression de la Cyp-D au cours de la maturation pourrait avoir lieu une fois les connexions neuronales établies de manière à protéger contre la mort cellulaire.

Des données récentes provenant de notre laboratoire ont montré les premières évidences suggérant que l'expression de la Cyp-D peut augmenter en réponse à un stress *in vivo* et est associée à une plus grande vulnérabilité à l'ouverture du PTP (40). Dans cette étude, des rats ont subi une dénervation du nerf sciatique entraînant l'atrophie du triceps sural, une condition qui engendre l'activation de la voie apoptotique intrinsèque (147). Les résultats ont montré que les mitochondries des muscles atrophiés expriment plus de Cyp-D et sont plus vulnérables à l'ouverture du PTP induit par le Ca^{2+} comparativement aux animaux contrôles (sham) (40).

Outre le niveau d'expression de la Cyp-D, des études ont montré que la localisation de la Cyp-D dans la mitochondrie est un facteur important dans la sensibilité à l'ouverture du PTP (30, 127, 155). Halestrap et al. (30) ont démontré que la Cyp-D, normalement soluble dans la matrice, se lie à la MIM en réponse au stress. Dans cette étude effectuée *in vitro* sur des mitochondries isolées, les auteurs ont démontré qu'un stress oxydatif (incubation avec du t-butyl hydroperoxide (tBH)) causant l'ouverture du PTP est associée à

un recrutement de la Cyp-D à la membrane interne (Figure 7) (30). Les auteurs ont également démontré que l'incubation des mitochondries avec la CsA (5 μ M) peut prévenir la liaison de la Cyp-D avec la MIM, seulement si le traitement à la CsA est effectué avant l'application du stress. Une fois le stress appliqué, l'ajout de CsA ne permet pas de dissocier la Cyp-D de la MIM dans ces conditions (30).

Bien qu'il soit clair que le recrutement de la Cyp-D à la membrane est un élément important, l'identité de ses partenaires de liaison qui sont impliqués dans la formation du PTP demeure un sujet de débat. En effet, bien qu'il ait été suggéré par certains que la protéine ANT constitue le principal partenaire de liaison de la Cyp-D responsable de son effet sur le PTP, des résultats plus récents ont montré que la Cyp-D peut se lier avec une haute affinité à plusieurs autres protéines (16, 166). De plus, une étude effectuée sur des mitochondries n'exprimant aucun des deux isoformes de l'ANT a démontré que la CsA inhibe le PTP, indiquant que la liaison de la Cyp-D à d'autres protéines que l'ANT peut induire l'ouverture du PTP (16, 99).

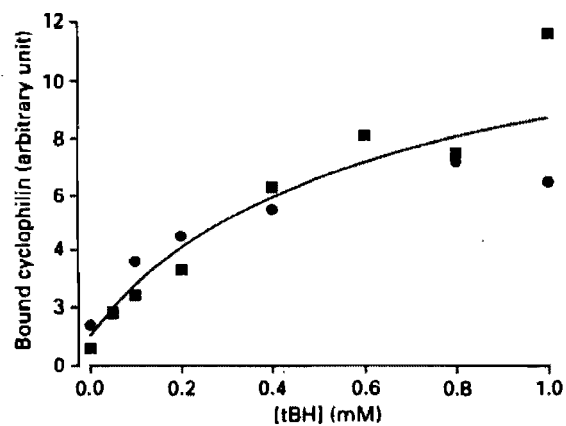


Figure 7 : Augmentation de l'expression de la cyclophiline-D membranaire en réponse à un stress oxydatif induit par le t-butyl hydroperoxide (tBH). L'augmentation de la sévérité du stress oxydatif se traduit par translocation de la cyclophiline-D de la matrice vers la membrane mitochondriale interne. Adaptée de Connern et Halestrap (30).

Espèces réactives de l'oxygène : un inducteur du PTP

La probabilité d'ouverture du PTP est grandement augmentée par une production excessive de ROS. Des études effectuées sur des mitochondries isolées ont démontré que les ROS agissent avec le Ca^{2+} , comme co-activateur du PTP (36). De plus, Kim et Lemasters (96) ont rapporté que les ROS étaient des effecteurs encore plus importants que le Ca^{2+} dans l'induction du PTP suivant un stress d'ischémie-reperfusion dans les cardiomyocytes (96).

La production de ROS dans la mitochondrie, principalement au niveau de la chaîne de transport des électrons, résulte en une augmentation de la concentration d'anions superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) qui est transformé en H_2O_2 par l'enzyme mitochondrial superoxyde dismutase (Figure 8) (102). Le H_2O_2 est ensuite réduit en eau par les enzymes glutathione peroxydase, thioredoxine peroxydase et catalase. Lorsque la quantité d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ produite augmente en présence de Ca^{2+} et de P_i , ou que les voies de réduction du H_2O_2 sont inactivées, l'accumulation de H_2O_2 en présence de Fe^{2+} produit la molécule radicalaire HO^{\bullet} . Cette molécule hautement réactive oxyde les groupements thiol (-SH) du PTP provoquant son ouverture (70, 102, 121).

De plus, comme il a été mentionné précédemment, Connern et Halestrap (30) ont démontré qu'un stress oxydatif augmente la liaison de la Cyp-D liée à la MIM, un phénomène associé à une vulnérabilité accrue à l'ouverture du PTP. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Baines et al. (6) chez les souris $\text{Ppif}^{-/-}$ qui montrent que l'absence de la Cyp-D rend les mitochondries plus résistantes au stress oxydatif.

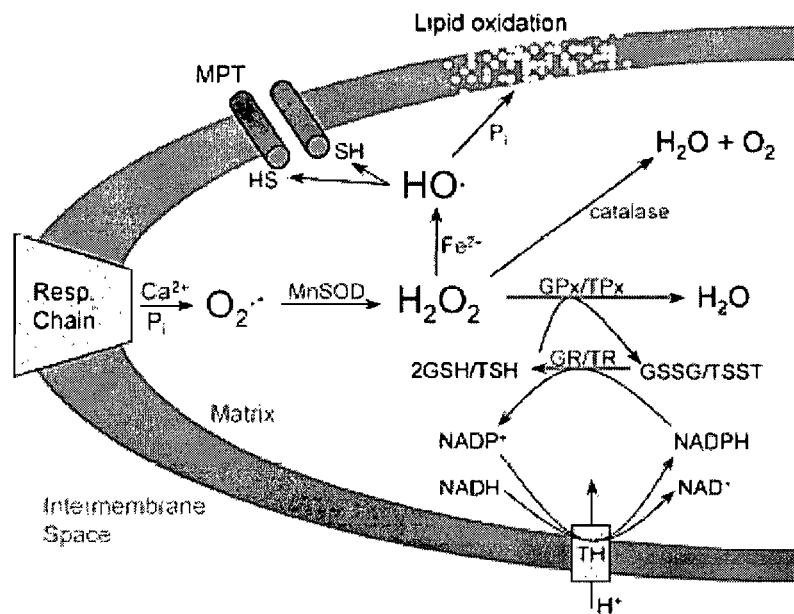


Figure 8 : Accumulation d'espèces réactionnelles de l'oxygène et induction du PTP. La production d' $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 provoque l'oxydation des groupements -SH du PTP, ce qui entraîne son ouverture. Adaptée de Kowaltowski et al. (102).

Autres régulateurs du PTP

Le Ca^{2+} , la Cyp-D et les ROS sont les inducteurs du PTP étudiés dans les travaux du présent mémoire, mais il est important de noter qu'il existe plusieurs autres modulateurs qui influencent la sensibilité du pore. Certains de ces modulateurs facilitent son ouverture notamment en augmentant sa sensibilité à son principal inducteur, le Ca^{2+} . Le phosphate inorganique (Pi) et le stress oxydatif sont des co-activateurs du pore et la présence de l'un ou l'autre de ces substrats diminue la quantité de Ca^{2+} requise pour provoquer l'ouverture du pore (73, 80, 81, 167). À l'opposé, la présence de certains cations divalents (Mg^{2+} , Sr^{2+} et Mn^{2+}) dans la matrice inhibe l'ouverture du PTP probablement en agissant comme antagonistes compétitifs du Ca^{2+} (15, 167). Les adénines nucléotides (ATP et ADP) agissent comme inhibiteurs du PTP alors que la déplétion de leur réserve mitochondriale favorise l'ouverture du pore (15, 35, 167). Le PTP est également sensible aux variations du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) sur une étendue de 180 à 120mV, où un potentiel bas favorise l'ouverture du pore (15, 167). Le pH influence aussi la probabilité d'ouverture du PTP, celui-ci étant diminué avec une acidification de la matrice (15, 95, 167). Par ailleurs, certaines protéines de la famille des Bcl-2 influencent la sensibilité du PTP. Bid et Bax favoriseraient l'ouverture du pore alors que Bcl-2 et Bcl_{XL} agissent comme inhibiteurs (32, 64, 157). Un résumé des modulateurs connus du PTP et de leurs rôles régulateurs est présenté au Tableau 1.

Agent	Probabilité d'ouverture du PTP	Références
Cyclophiline-D membranaire	Augmentée	(6, 30, 55, 87)
Surcharge de Ca ²⁺ matriciel	Augmentée	(33, 52, 167)
Production excessive de ROS	Augmentée	(34, 96)
Mg ²⁺ , Sr ²⁺ , Mn ²⁺ matriciel	Diminuée	(15, 50, 167)
ATP	Diminuée	(53, 167)
ADP	Diminuée	(35, 167)
Pi	Augmentée	(73, 80, 81, 167)
pH	Une diminution du pH matriciel diminue la probabilité	(15, 95)
Potentiel de surface	Une réduction entraîne une diminution de la probabilité	(19)
Voltage	Une augmentation entraîne une diminution de la probabilité	(52, 167)
Bax, Bid	Augmentée	(32, 64, 157)
Bcl-2, BclXL	Diminuée	(32, 64, 157)
Cyclosporine A	Diminuée	(37, 167)

Tableau 1 : Régulateurs du PTP et leurs effets sur la probabilité de son ouverture.

Rôles des mitochondries dans le remodelage hypertrophique ventriculaire pathologique et dans l'insuffisance cardiaque.

Introduction

L'hypertrophie ventriculaire pathologique est une réponse du cœur à différents types de stress incluant la surcharge de travail ou la perte de masse cardiaque à la suite d'un infarctus (14). Cette réponse est accompagnée d'une variété de changements au niveau des cardiomyocytes et de la matrice extracellulaire (14, 56, 93). Or, la plupart de ces changements apparaissent délétères puisqu'ils sont associés à une augmentation du taux de mortalité et de morbidité et à une progression vers l'insuffisance cardiaque (13, 90). L'insuffisance cardiaque peut être la conséquence tardive de plusieurs pathologies dont l'hypertension artérielle, l'athérosclérose ischémique et l'insuffisance valvulaire (111).

Au Canada, l'impact des maladies cardiovasculaires, dont l'insuffisance cardiaque est une des principales affections, sur la qualité de vie et sur le plan socio-économique est en croissance (71). Ceci est relié d'une part au vieillissement de la population, puisque cette pathologie affecte d'une manière prépondérante les personnes âgées. Le rapport de la fondation des maladies du cœur du Canada de 2003 indique que cette croissance risque de se poursuivre puisque les adolescents et les jeunes adultes d'aujourd'hui ont des comportements malsains reliés à la sédentarité, au tabagisme et aux mauvaises habitudes alimentaires (71). Selon les statistiques de 1998, sur le plan socio-économique, les maladies cardiovasculaires coûtent aux contribuables Canadiens plus de 18,4 milliards en frais directs et indirects (71). De 2000 à 2001 les maladies cardiovasculaires ont représenté 18% de l'ensemble des hospitalisations au Canada. Plus particulièrement, l'insuffisance cardiaque atteint plus de 400 000 Canadiens, et on recense plus de 50 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année (101).

Bien que l'association entre l'hypertrophie cardiaque et le développement de l'insuffisance cardiaque soit reconnue, les raisons pour lesquelles certains cœurs hypertrophiés progressent vers un stade de décompensation alors que d'autres ne progressent pas vers cet état de défaillance systolique demeurent mal connues (14, 93). Parmi les facteurs impliqués dans la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque, les mitochondries ont fait l'objet de nombreuses études, étant donné leur rôle central dans la production d'énergie, dans la production de radicaux libres ainsi que dans le processus de mort cellulaire. La section qui suit vise à présenter une revue des évidences expérimentales qui démontrent que dans le cœur insuffisant, les mitochondries présentent des déficiences structurales et fonctionnelles et participent à la mort cellulaire.

Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans le cœur insuffisant

Plusieurs études menées chez l'humain et à l'aide de divers modèles animaux ont démontré la présence d'anomalies mitochondriales dans le cœur insuffisant (108, 115, 144, 151). Des analyses structurales montrent que les mitochondries présentent des anomalies des membranes internes et externes ainsi qu'une réduction de la densité des cristae et une augmentation du gonflement de la matrice (Figure 9) (130, 136).

Au plan fonctionnel, des études menées chez l'homme et chez les animaux ont démontré une diminution de l'activité de plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs mesurée dans le tissu cardiaque entier ou sur des mitochondries isolées (22, 84-86, 123, 141). Chez l'Homme, Jaretta et al. (85) ont rapporté une diminution de

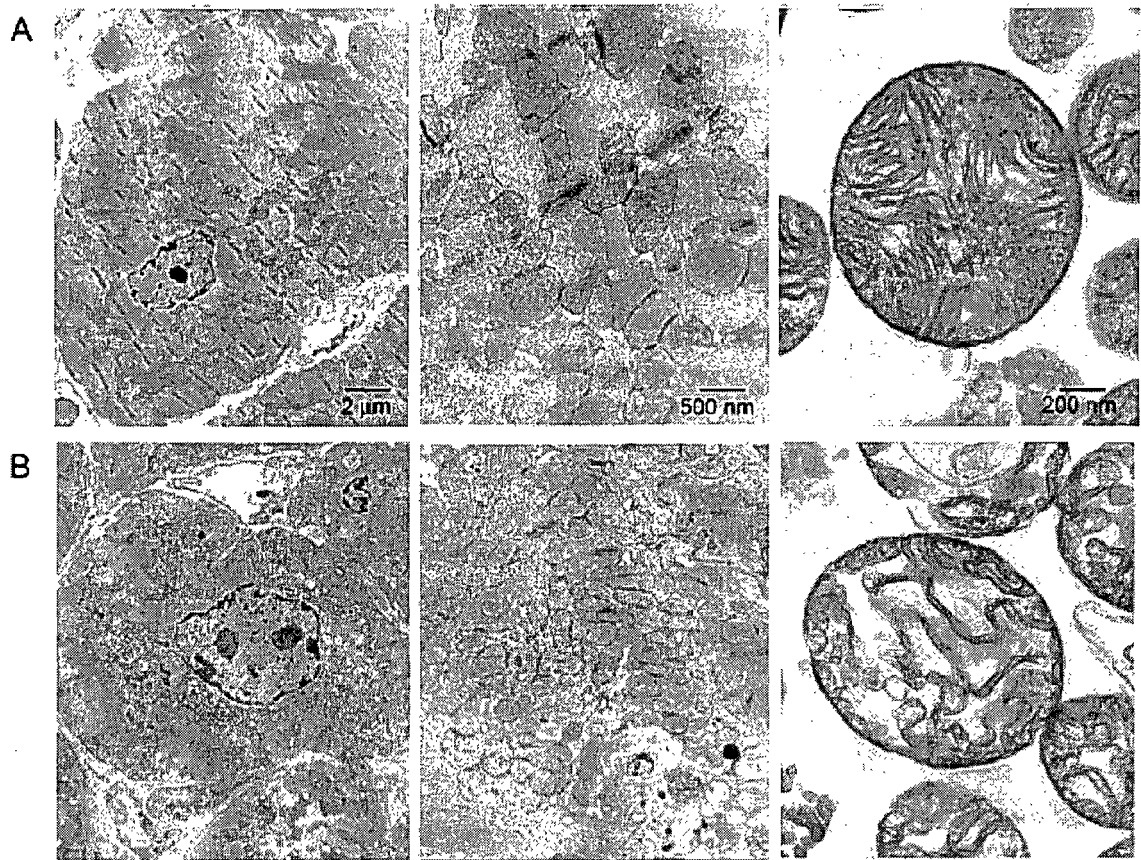


Figure 9 : Morphologie des cardiomyocytes et des mitochondries dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par le TNF α . Les micrographies électroniques démontrent que la surexpression de la cytokine TNF α (qui est impliquée dans le développement de l'insuffisance cardiaque) dans le cœur de souris, induit de profondes altérations morphologiques des mitochondries *in situ* dans le cœur (images de gauche et du centre) ou *in vitro* après leur isolation (image de droite). (A) Souris contrôles, (B) souris transgéniques TNF α . Adapté de Ozcan et al (130).

l'activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques (Tableau 2). De manière similaire, Buchwald et al. (22) ont rapporté une diminution de l'activité du complexe III ($3,77 \pm 0,82$ vs $4,95 \pm 1,15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) et du complexe V ($2,63 \pm 0,96$ vs $3,65 \pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) de la chaîne respiratoire chez des patients atteints d'une cardiopathie dilatée.

Javadov et al. (86) ont montré que dans le cœur insuffisant, les changements enzymologiques se traduisent par une diminution de la capacité respiratoire des mitochondries isolées, et ceci en présence d'une variété de substrats énergétiques alimentant la chaîne respiratoire à différents niveaux (Tableau 3).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que la production de ROS était augmentée dans les mitochondries de cœurs insuffisants (63, 83, 84, 98). Ide et al. (84) en utilisant la résonance paramagnétique électronique (ESR) de la sonde hydroxy-TEMPO. En effet, les auteurs ont démontré que les particules mitochondriales isolées de cœurs insuffisants produisaient 2,8 fois plus d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire que ceux provenant de cœurs normaux en présence de NADH. De plus, la présence de SOD ou de SOD et de catalase a atténué le signal ESR dans les mêmes conditions (Figure 10) (84). La plus grande production de ROS chez les animaux en insuffisance cardiaque était accompagnée d'une plus grande quantité de peroxydes lipidiques (84), d'une présence accrue de mutations de l'ADN mitochondrial (83) et d'une réduction de l'activité enzymatique des complexes I, III et IV (83). D'autres études ont rapporté une augmentation de la fréquence des mutations de l'ADN mitochondrial dans les cœurs d'animaux insuffisants (83, 109, 116, 117). Ce phénomène a été attribué à la production accrue de

	IDC (n=17)	IC (n=6)	Controls (n=17)	P-value ^b
Complex I	120±36	133±35	132±61	n.s.
Complex II	286±102 ^c	307±115	392±119	<0.05
Complex III	371±110 ^c	456±110 ^c	703±266	<0.0001
Complex IV	578±202	655±393	589±288	n.s.
Complex I+III	63±40 ^c	73±22 ^c	163±75	<0.0001
Citrate synthase	422±156	416±106	486±127	n.s.

^a Activity values expressed as nmol/min/mg prot.

^b ANOVA test for the three groups taken together.

^c These values were significantly lower than control values in the Student–Newman–Kreuls post-hoc test.

Tableau 2 : Activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients humains atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques. Le tableau présente l'activité des complexes I, II, III, I+III et de la citrate synthase mesuré dans l'homogénat total provenant de biopsies effectuées au moment de la chirurgie de transplantation cardiaque sur le cœur de patients insuffisants atteints de cardiopathies dilatées (IDC) ou ischémiques (IC). Les valeurs témoins ont été déterminées sur les mitochondries de cœurs transplantés. Adapté de Jarreta et al (85).

Groups	Sham	CAL
<i>n</i>	9	9
Citrate synthase (units/mg protein)	2.63 ± 0.12	1.97 ± 0.03 **
<i>Rates of respiration (nmol O per min/mg of protein)</i>		
<i>State 2</i>		
2-Oxoglutarate	27 ± 1	25 ± 1
Succinate	69 ± 1	61 ± 1 **
Glutamate	29 ± 2	29 ± 1
<i>State 3</i>		
2-Oxoglutarate	235 ± 8	203 ± 8 **
Succinate	169 ± 3	145 ± 6 **
Glutamate	139 ± 4	98 ± 4 **
<i>Ascorbate + TMPD</i>		
2-Oxoglutarate	299 ± 10	264 ± 12 *
Succinate	308 ± 9	283 ± 10
Glutamate	303 ± 9	274 ± 11 *
<i>State 3/state 2 (RCI)</i>		
2-Oxoglutarate	9.0 ± 0.7	8.2 ± 0.5
Succinate	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Glutamate	4.8 ± 0.3	3.5 ± 0.2 **
<i>State 3/ascorbate</i>		
2-Oxoglutarate	0.79 ± 0.02	0.77 ± 0.02
Succinate	0.55 ± 0.01	0.51 ± 0.01 *
Glutamate	0.46 ± 0.02	0.37 ± 0.01 **

Tableau 3 : Les résultats représentent la moyenne ± S.E.M. de 9 expériences par groupe. * P<0,05; ** P<0,01 groupe CAL vs groupe sham. Adaptée de Javadov et al. (86).

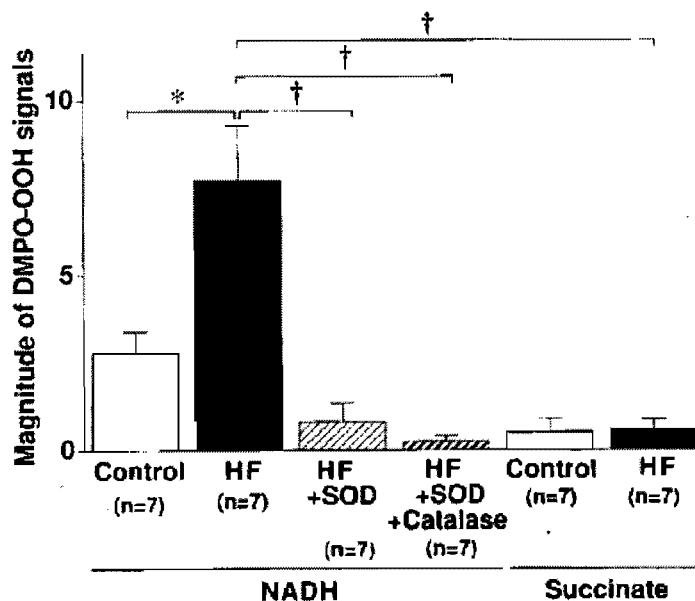


Figure 10 : Production de radicaux libres par des particules mitochondriales isolées à partir des cœurs normaux et insuffisants. Les résultats représentent la production d' $O_2^{\bullet-}$ mesurée par résonance paramagnétique électronique du 5,5'-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO-OOH) sur des particules mitochondriales provenant de cœurs normaux (contrôles) et de cœurs insuffisants (HF) suite à un remodelage post-infarctus chez le chien. Les substrats utilisés pour alimenter la chaîne respiratoire au niveau du complexe I et II étaient le NADH (200 $\mu\text{mol/L}$) et le succinate (10 mmol/L) respectivement. Le signal DMPO relié à la production d' $O_2^{\bullet-}$ était significativement plus bas dans les deux groupes expérimentaux en présence de SOD (100U/mL) ou de SOD (100 U/mL) avec catalase (500 U/mL) témoignant de la spécificité du signal DMPO-OOH. La différence entre contrôle et HF est uniquement observée en présence de NADH suggérant qu'une altération du complexe I est responsable de la plus grande production d' $O_2^{\bullet-}$. Les valeurs représentent la moyenne \pm S.E.M. * : Significativement différent des valeurs contrôles ($p < 0,05$); † Significativement différent du groupe HF en présence de succinate ($p < 0,05$). Adaptée de Ide et al (84).

ROS par la mitochondrie puisque l'ADN mitochondrial se trouve à proximité de la production de ROS et que l'organelle possède un système limité de réparation de l'ADN.

Par ailleurs, il semble exister une réponse biphasique du système de défense antioxydant au cours du remodelage ventriculaire. En effet, quelques études ont rapporté une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes dont la SOD, la catalase, la glutathione peroxydase ainsi qu'une augmentation du contenu en vitamine E au début de la pathologie, alors que le cœur est en phase d'hypertrophie compensée (12, 47, 78, 79). Cependant, la situation est rapidement renversée alors que les capacités de défense décroissent sous les niveaux normaux (47, 78, 79). Il a été suggéré que l'augmentation de la production de ROS accompagnée de la réduction de l'efficacité du système de défense contribuerait à la décompensation cardiaque. Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans la phase d'hypertrophie compensée

Quoique l'insuffisance cardiaque s'accompagne de dysfonctions mitochondriales multiples, la majorité des études qui ont été effectuées à un stade précoce du remodelage cardiaque rapporte peu ou pas de dysfonctions mitochondriales (154). En effet, aucune des modifications structurales rapportées dans le cœur insuffisant n'a été identifiée au stade d'hypertrophie compensée. Cependant, il semble néanmoins y avoir des modifications au niveau de l'organisation du réseau mitochondrial et de la morphologie des cristae durant le remodelage ventriculaire. La surcharge volumique a été associée à une diminution de la taille moyenne des mitochondries et à une augmentation de leur nombre, permettant ainsi le maintien de la masse mitochondriale totale des cardiomyocytes (154). Par ailleurs, Goto et al. (60) ont démontré un accroissement de la densité des cristae au niveau de plusieurs mitochondries chez le rat spontanément hypertendu (SHR) à un âge où l'hypertrophie

cardiaque commence à se développer (10 semaines). Cependant, l'impact de ces changements structuraux demeure inconnu à ce jour.

Sur le plan fonctionnel, bon nombre d'études ont rapporté que la capacité respiratoire est normale voir même augmentée dans le cœur hypertrophié (20, 43, 105, 110, 148, 152). Une étude de Sordahl et al (148) menée avec un modèle de constriction de l'aorte chez le lapin illustre bien ce phénomène. Les auteurs ont démontré que les mitochondries provenant des cœurs en stade compensé d'hypertrophie affichaient une respiration significativement plus élevée que les mitochondries isolées d'animaux témoins en présence des substrats du complexe I (glutamate-malate) et d'ADP (figure 11). Toutefois, les mitochondries des cœurs insuffisants avaient une capacité respiratoire sous les valeurs des mitochondries provenant des cœurs témoins. Cet accroissement de la capacité respiratoire dans le cœur compensée n'est pas rapporté dans tous les modèles de remodelage ventriculaire. En effet,

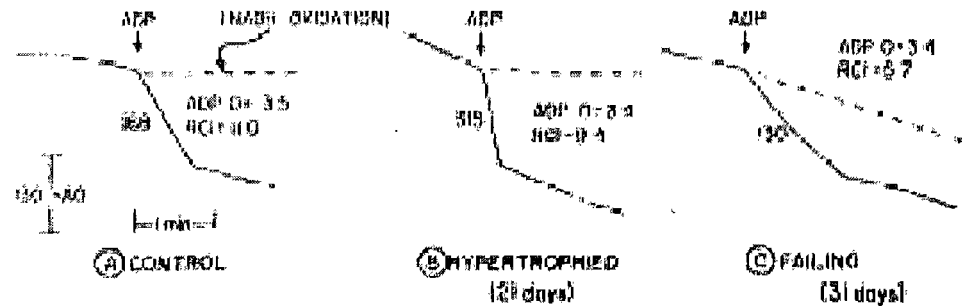


Figure 11 : Fonction respiratoire mesurée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs en phase d'hypertrophie compensée et d'insuffisance. La figure présente des tracés de respiration typiques obtenus sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de lapins (A) normaux, (B) durant la phase d'hypertrophie compensée ou (C) d'insuffisance induites par constriction de l'aorte. Les mitochondries étaient énergisées avec les substrats du complexe I (glutamate-malate). L'ADP était ajoutée pour induire la respiration maximale (stade 3) puis la respiration basale (stade 4) était obtenue après la phosphorylation complète de l'ADP. Les valeurs maximales (en nanoatome d'O/min/mg protéine) obtenues en stade 3 sont indiquées à gauche des tracés. Les rapports ADP : O et RCI (stade 3/stade 4) sont indiqués à droite comme témoins de l'efficacité du couplage entre la respiration et la phosphorylation. La ligne pointillée indique la réponse de la respiration lorsque du NADH exogène était ajouté en substitution de l'ADP. Une augmentation de la respiration en présence de NADH témoigne d'une atteinte à l'intégrité de la membrane interne. Adaptée de Sordahl et al. (148).

plusieurs études n'ont rapporté aucune modification de la respiration mitochondriale de base dans différents modèles d'hypertrophie pathologique (31, 43, 105). À titre d'exemple, Brookes et al. (20) ont rapporté aucune modification de la respiration mitochondriale stimulée par l'ajout d'ADP dans un modèle de constriction de l'aorte chez le rat Sprague-Dawley huit semaines post-chirurgie, et ce, en présence des substrats pour le complexe I, II et IV (Figure 12).

Par ailleurs, dans cette même étude, Brookes et al. (20) ont rapporté que les mitochondries provenant de cœurs hypertrophiés étaient significativement plus sensibles à l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}) (Figure 13), un facteur de régulation de la respiration exerçant un effet inhibiteur sur le complexe IV (28). Or, il a été rapporté que l'expression de la NO^{\bullet} synthase (iNOS) est augmentée dans le cœur insuffisant (120, 156), et également dans le cœur compensé (156) (Figure 14). Ces résultats suggèrent donc que la respiration mitochondriale *in vivo* pourrait être altérée au cours de la phase compensée d'hypertrophie et que des modifications subtiles de la fonction mitochondriale peuvent exister malgré une capacité respiratoire apparemment normale en condition basale.

L'ensemble des études disponibles suggère donc que les mitochondries affichent des dysfonctions importantes dans le cœur insuffisant, mais qu'aucune modification majeure de la morphologie et des fonctions de base ne semblent détectables dans le cœur en phase d'hypertrophie compensée. Ces observations ne permettent donc pas de conclure avec certitude si les dysfonctions mitochondriales jouent un rôle causal dans la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque ou si elles ne sont qu'une conséquence tardive de la décompensation. Elles mettent également en évidence notre manque de compréhension des mécanismes par lesquels les mitochondries développent ces dysfonctions. Cependant, il est important de noter que la majorité des études répertoriées ont mesuré la capacité

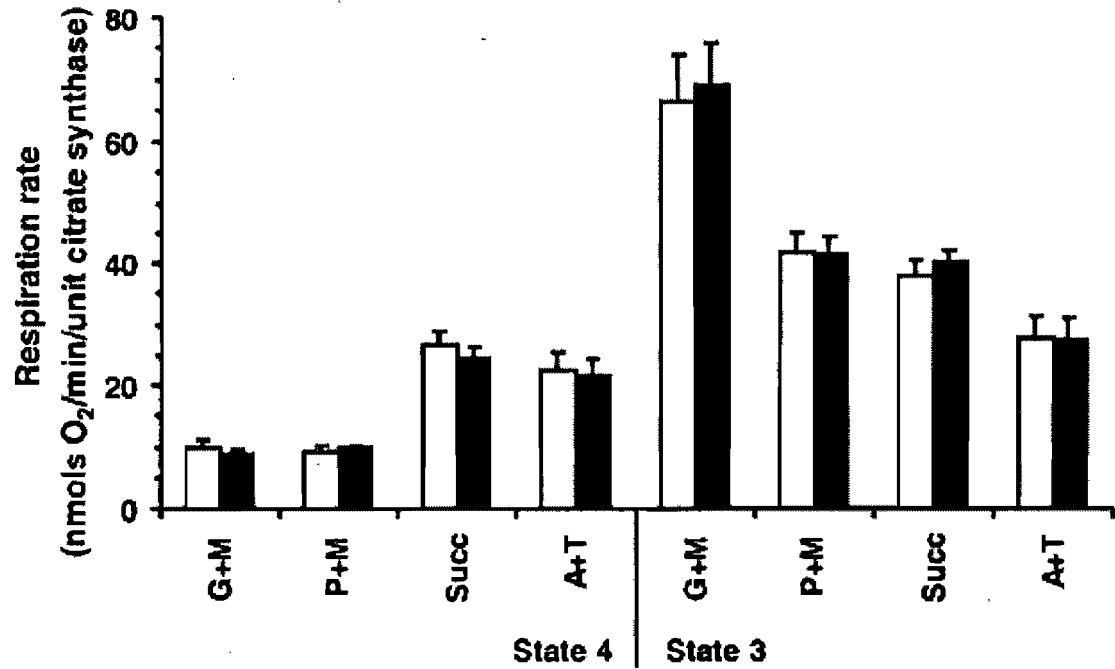


Figure 12 : Propriétés respiratoires de mitochondries isolées à partir de cœurs normaux ou en stade d'hypertrophie compensée à la suite d'une constriction de l'aorte abdominale. La figure présente la vitesse de respiration évaluée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de rats contrôles (□) ou au stade compensé d'hypertrophie huit semaines suivant une chirurgie de constriction de l'aorte abdominale (■). Les valeurs moyennes \pm S.E.M. de la respiration en stade 3 et 4 en présence de glutamate-malate (G+M), pyruvate-malate (P+M), succinate (Succ) et TMPD-ascorbate (A+T) sont présentées (n=5 dans chaque type d'expérience). Adaptée de Brookes et al. (20).

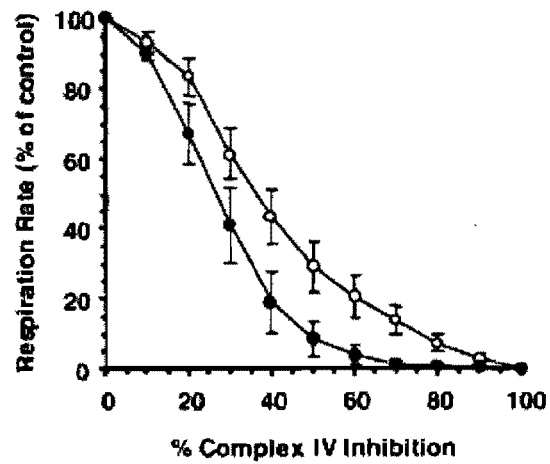


Figure 13 : Effet de l'hypertrophie cardiaque sur la respiration mitochondriale lors d'une inhibition du complexe IV avec NO^{\bullet} . Les mitochondries ont été isolées à partir du ventricule gauche provenant de rats contrôles (○) et de rats soumis à huit semaines de constriction de l'aorte abdominale (●). La respiration a été titrée avec des concentrations croissantes d'un donneur de NO^{\bullet} . Chaque point représente la moyenne \pm S.E.M. d'au moins quatre expériences différentes. Adaptée de Brookes et al. (20).

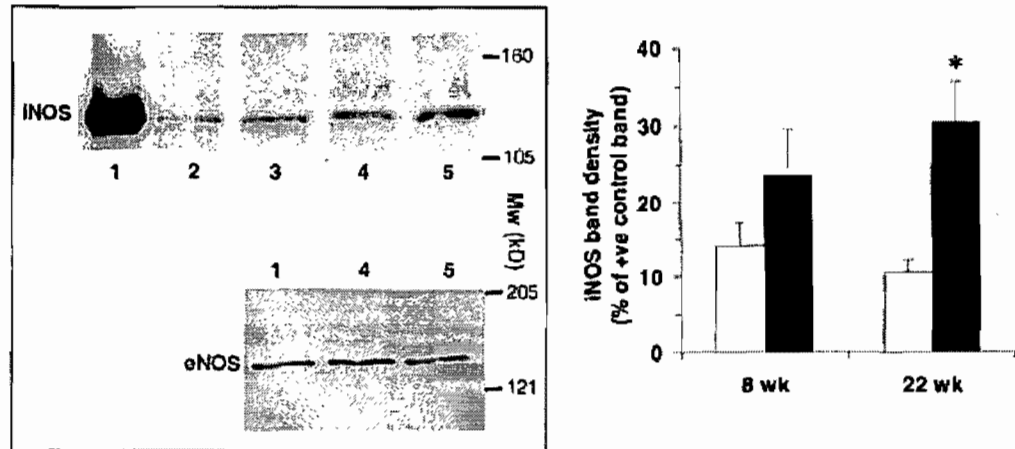


Figure 14 : Effet de l'hypertrophie cardiaque sur l'expression de la NO synthase. La figure présente les niveaux d'expression de la NOS inductible (iNOS : 130KDa) et endothéliale (eNOS : 140 KDa) dans les cœurs de rats normaux ou soumis à une constriction de l'aorte abdominale (BAND). A : Dans les gels représentatifs, les puits contenaient respectivement : 1) un contrôle positif (des lysats de macrophages de souris pour iNOS et des cellules endothéliales humaines pour eNOS), 2) un contrôle huit semaines, 3) un BAND huit semaines, 4) un contrôle 22 semaines et 5) un BAND 22 semaines. B) Analyse densitométrique des résultats obtenus pour l'expression de iNOS (contrôles : □, BAND : ■). Les valeurs représentent la moyenne \pm S.E.M. d'au moins quatre expériences différentes. Adaptée de Brookes et al. (20).

respiratoire sur des mitochondries isolées et dans des conditions standardisées qui ne représentent pas les conditions rencontrées *in situ* dans les cardiomyocytes. L'étude de Brookes (20) démontrant une modification de la régulation du complexe IV par le NO[•] porte à croire que la régulation de la respiration pourrait être affectée avant même l'apparition de déficits au niveau des complexes de la chaîne respiratoire.

Activation des mécanismes mitochondriaux de mort cellulaire dans le cœur insuffisant

Au niveau cellulaire, l'insuffisance cardiaque est, entre autres, caractérisée par une augmentation de la mort cellulaire. Des études menées chez l'Homme et l'animal ont rapporté la présence accrue de plusieurs marqueurs de mort cellulaire apoptotique comme la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN génomique (mesuré par marquage TUNEL) (91, 123, 124, 126, 129). Le stress associé à l'insuffisance cardiaque entraîne également la mort des cellules par nécrose (87, 125). Enfin, il a été démontré que l'autophagie est activée dans le cœur insuffisant, quoique le rôle de ce mécanisme de mort cellulaire ne soit pas bien connu (77, 100).

Bien que de multiples mécanismes peuvent mener à la mort cellulaire, plusieurs études menées chez des patients humains et sur des modèles animaux d'insuffisance cardiaque ont rapporté une présence accrue de cytochrome c dans le cytosol (126, 140) ainsi qu'une augmentation de l'activation des caspases 9 (140) et 3 (124, 126), ce qui suggère clairement une implication des mitochondries. Bien que les mécanismes de relâche de facteurs pro-apoptotiques demeurent mal compris, certaines études ont associé ces événements à l'augmentation de l'expression de Bax et à la diminution de l'expression de Bcl-2 (124, 129, 139). Cette augmentation du ratio Bax/Bcl-2 aurait pour effet de permettre

la formation d'oligomères Bax/Bak dans la MEM et la relâche consécutive des facteurs pro-apoptotiques (61). Toutefois, les protéines Bax et Bcl-2 influencent également l'ouverture du PTP (voir la section «Mécanismes de perméabilité des membranes mitochondriales»). De plus, l'ouverture transitoire du PTP est également perçue comme un signal permettant le recrutement de Bax à la membrane externe (18, 44, 131, 160). Il est donc possible que ce mécanisme joue également un rôle dans l'activation de la voie mitochondriale de mort cellulaire.

Il existe maintenant plusieurs évidences démontrant que l'ouverture du PTP est accrue dans le cœur insuffisant. Javadov et al. (86) ont utilisé la technique de séquestration mitochondriale du déoxyglucose tritié (^3H -DOG) pour mesurer l'ouverture de PTP dans des cœurs de rats perfusés *ex vivo* après un remodelage induit par un infarctus. Les résultats ont montré une augmentation de l'ouverture du PTP après 12 et 16 semaines de remodelage comparativement aux cœurs normaux en condition de perfusion normoxique. Des résultats similaires ont été rapportés par Sharov et al. (144) dans des cardiomyocytes à l'aide d'un modèle d'insuffisance cardiaque induite par « pacing » chez le Chien. Finalement, une étude a démontré que les mitochondries isolées à partir du cœur insuffisant provenant de souris transgéniques sur-exprimant le $\text{TNF}\alpha$, une cytokine impliquée dans l'insuffisance cardiaque et exprimée de manière cardio-spécifique, étaient plus vulnérables à l'ouverture du PTP par surcharge calcique *in vitro* (130). Dans cette étude, la quantité de Ca^{2+} requise pour induire l'ouverture du PTP sur des mitochondries isolées était significativement plus basse chez ces souris comparativement aux souris contrôles.

Comme ces études ont toutes été effectuées à un stade tardif de la pathologie, il est difficile de conclure à partir de ces données si l'ouverture du PTP contribue à la progression vers l'insuffisance ou constitue simplement une conséquence tardive.

Cependant, deux arguments nous mènent à penser que l'occurrence d'ouverture du PTP s'accroît durant la phase compensée du remodelage ventriculaire et contribue à la progression vers l'insuffisance cardiaque. La première évidence est que dans l'étude de Javadov et al. (86), les auteurs ont démontré qu'un traitement chronique avec l'EMD87580, un inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ , permettait de diminuer le remodelage cardiaque et de diminuer de 40% l'augmentation de l'occurrence d'ouverture du PTP dans le cœur. Cependant, puisqu'il est possible que l'inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ exerce d'autres effets protecteurs, il n'est pas certain que l'inhibition du PTP soit le mécanisme responsable des effets bénéfiques de l'EMD87580. La deuxième évidence provient d'une étude récente du groupe de Molkenin (125) démontrant que la suppression du gène *Ppif* codant pour la Cyp-D, prévenait le remodelage cardiaque pathologique, la nécrose et la mortalité dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par la sur-expression de la sous-unité $\beta_2\alpha$ des canaux calciques de type L du sarcolème (CCTL) (Figure 15). À l'opposé, les souris CCTL qui sur-exprimaient la protéine anti-apoptotique Bcl-2 n'étaient pas protégées contre la mort cellulaire et l'insuffisance cardiaque (125) indiquant clairement que la prévention de l'ouverture du PTP jouait un rôle clé dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Cependant il est important de considérer que le rôle du PTP dans ce modèle transgénique est amplifié par la nature du stimulus initial i.e. la surcharge calcique qui est un inducteur majeur de l'ouverture du pore. D'autres études sont requises pour déterminer clairement si l'ouverture accrue du PTP contribue à la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque induite de manière plus physiologique.

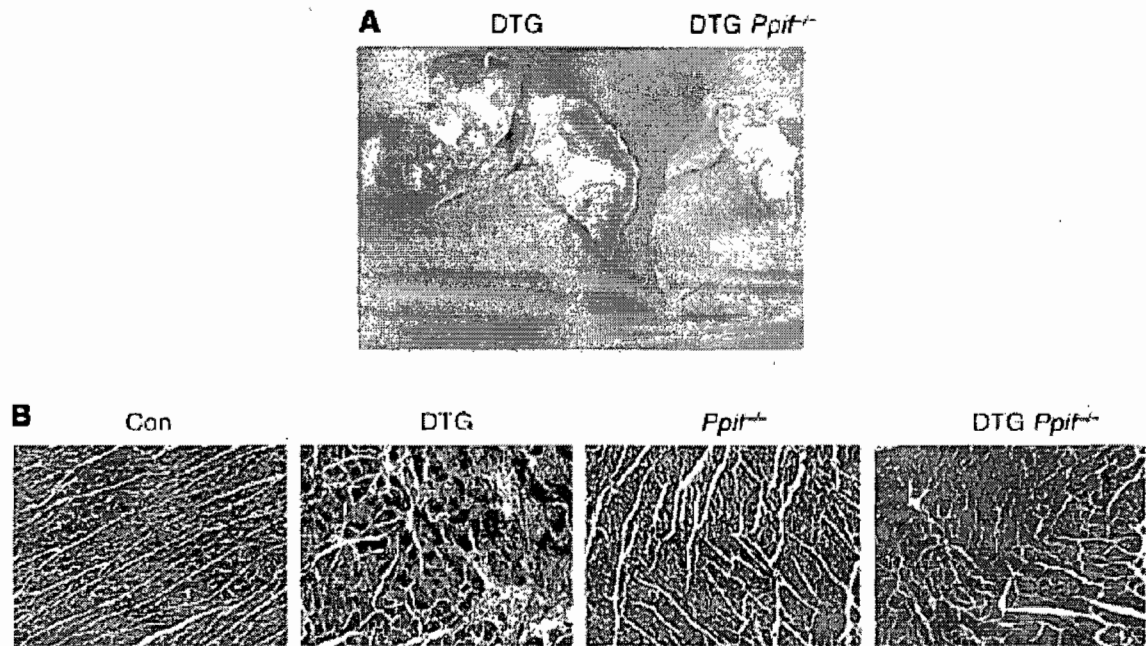


Figure 15 : La perte de cyclophiline-D (*Ppif*^{-/-}) dans les souris sur-exprimant la sous-unité β 2a des canaux calciques de type L du sarcolème (DGT). Les cœurs de souris n'exprimant pas la CyP-D et sur-exprimant la sous-unité β 2a des canaux calciques de type L du sarcolème (DGT) ne développaient pas d'hypertrophie ventriculaire ou auriculaire et ne présentaient pas d'indication de fibrose contrairement au cœur DGT. Adaptée de Nakayama et al. (125).

La vulnérabilité au stress : un contributeur potentiel dans la transition vers l'insuffisance cardiaque

La pathogenèse de l'insuffisance cardiaque se développe sur une période pouvant aller de quelques semaines à quelques années. Le remodelage ventriculaire prenant place au début de la pathologie est accompagnée d'une détérioration des fonctions systoliques alors que les cardiomyocytes sont vraisemblablement soumis à des périodes de stress prolongées allant des hypoxies ou des ischémies transitoires locales, aux réponses inflammatoires, au stress oxydatif et au déséquilibre de l'homéostasie calcique (2, 86, 90, 136). Un concept récemment mis de l'avant propose que les cardiomyocytes développent une vulnérabilité au stress pendant l'hypertrophie compensée, qui se traduit par une susceptibilité accrue au déclenchement des processus de mort cellulaire (91). Une étude menée par Kang et al (91) a évalué la vulnérabilité des cardiomyocytes à une variété de stress *in vitro* chez des rats Dahl (une souche de rats affichant une hypertension chronique et un remodelage ventriculaire lorsqu'ils sont soumis à une diète salée) durant la période compensée et décompensée de la pathologie. Les résultats ont démontré que durant la phase compensée, les cardiomyocytes provenant de cœurs hypertrophiés affichaient un plus grand pourcentage de mort cellulaire en réponse à une ischémie-reperfusion simulée, un stress oxydatif induit par une incubation en présence de H₂O₂ ou une exposition à la staurosporine (Figure 16).

Par ailleurs, la présence accrue de cellules apoptotiques, mesurée par marquage TUNEL dans le cœur, n'était évidente que lorsque le cœur avait atteint l'état d'insuffisance, suggérant clairement que la vulnérabilité au stress durant la phase compensée précédait l'activation franche de la mort cellulaire dans ce modèle. Il est important de noter que l'augmentation de la vulnérabilité du cœur hypertrophié à des stress aigus comme

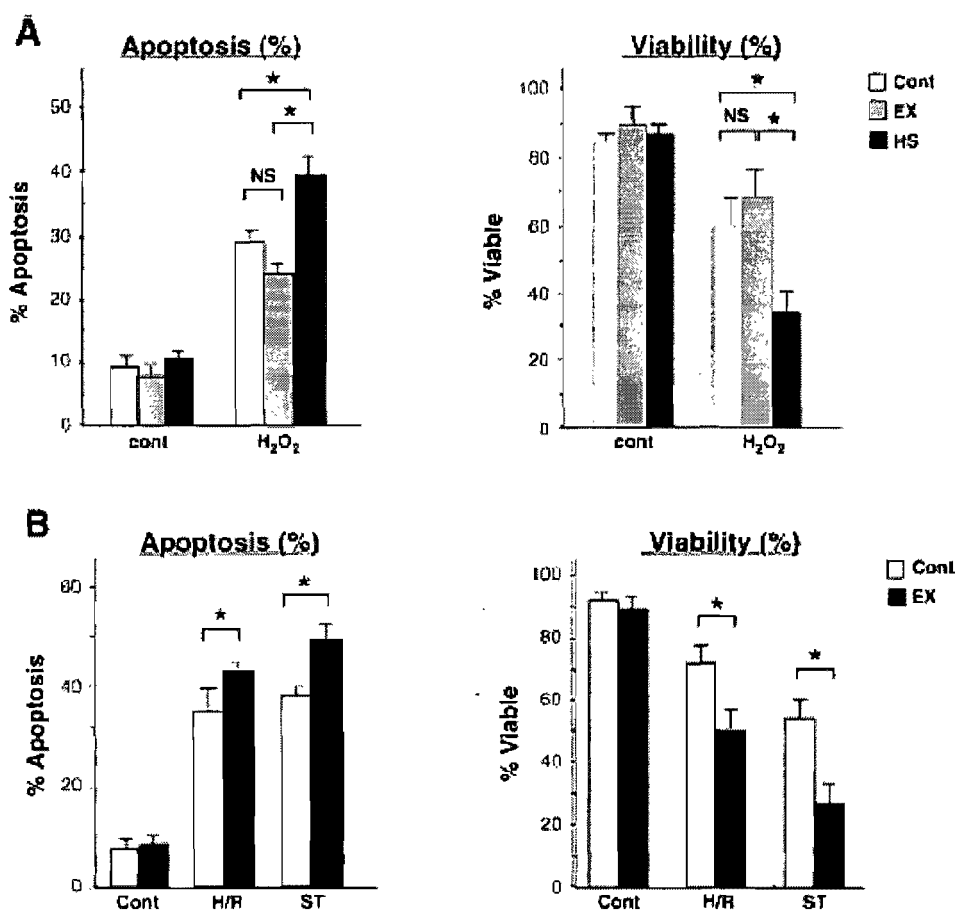


Figure 16 : Effet du remodelage ventriculaire hypertrophique sur la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress *in vitro*. La figure présente le pourcentage de cellules apoptotiques et la viabilité cellulaire en absence ou en présence de stress *in vitro* (A;B) incluant (A) l'incubation en présence H₂O₂, (B) l'ischémie-reperfusion simulée (6-18heures respectivement) et un traitement à la staurosporine. Les tests ont été effectués sur des myocytes obtenus à partir de cœurs d'animaux contrôles, d'animaux ayant une hypertrophie induite par l'exercice (EX) ou induite par surcharge de pression (HS). Le modèle d'hypertension utilisé était le rat Dahl, une souche développant une hypertension spontanée en réponse à une diète salée. Les rats contrôles et entraînés étaient de la même souche, mais n'ont pas été soumis à la diète salée. Les cardiomyocytes provenant des cœurs

en hypertrophie pathologique compensée (HS) sont plus vulnérables aux trois formes de stress imposées. Les valeurs représentent la moyenne \pm S.E.M. (n = 6 dans chaque condition). NS : non significatif; * : significativement différent du contrôle (P<0,05). Adaptée de Kang et al. (91).

l'ischémie-reperfusion a également été rapportée par d'autres groupes, bien que ces études ne se soient pas attardées au rôle de ce phénomène dans la progression de la pathologie (2).

Étant donné que l'ouverture du PTP joue un rôle important dans la mort cellulaire induite par l'ischémie-reperfusion (42, 49, 67) et par le stress oxydatif (25, 46, 112, 128), nous avons émis l'hypothèse que le développement d'une susceptibilité mitochondriale à l'ouverture du PTP pourrait contribuer à la vulnérabilité cellulaire au stress observée dans le cœur hypertrophié. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle d'hypertrophie pathologique induite par une fistule aorto-cavale (AFC) chez le rat WKHA. Cette souche recombinante consanguine est dérivée d'une sélection phénotypique de la progéniture provenant de croisements hybrides F2 entre le rat spontanément hypertendu SHR et le rat Wistar-Kyoto (WKY). Bien qu'ils aient une pression artérielle normale et identique aux rats WKY, les rats WKHA développent une hypertrophie cardiaque et affichent une plus grande susceptibilité au remodelage pathologique induit par surcharge. Ce modèle a été utilisé dans le laboratoire de notre collègue, le Dr. Christian F. Deschepper, pour étudier les gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque (149). Des études antérieures provenant de ce laboratoire ont démontré que chez le rat WKHA, une hypertrophie compensée est systématiquement observable 12 semaines après l'induction de la surcharge volumique par ACF (149). Notre laboratoire a donc isolé les mitochondries cardiaques de rats WKHA ayant une ACF et de rats contrôles ayant subi une chirurgie simulée, afin de caractériser leurs fonctions de base ainsi que leur susceptibilité au stress *in vitro*.

Dans cette étude, Marcil et al. (114) n'ont observé aucune différence entre les deux groupes expérimentaux au niveau de la respiration basale (V_0) et de la respiration maximale, stimulée par l'ajout d'ADP (V_{ADP}) en présence des substrats énergétiques (glutamate-

malate) alimentant le complexe I de la chaîne respiratoire (Figure 17) (114). De plus, le potentiel de membrane mesuré en condition basale était similaire chez les témoins et les ACF. Cependant, suite à une période d'anoxie-réoxygénation, les mitochondries de rats ACF affichaient une dysfonction respiratoire significativement plus sévère que les mitochondries de rats témoins (Figure 18). De manière intéressante, la présence de CsA durant la période d'anoxie-réoxygénation a permis d'abolir la différence entre les deux groupes expérimentaux, suggérant que l'ouverture du PTP était en grande partie responsable de la dysfonction respiratoire accrue chez les mitochondries des rats ACF.

De manière à savoir si la plus grande vulnérabilité des mitochondries de rats ACF pouvait se manifester en réponse à d'autres types de stress, les mitochondries ont été soumises à des tests de surcharge calcique, le Ca^{2+} étant un inducteur puissant du PTP. Ce test consistait à soumettre les mitochondries à des ajouts successifs de Ca^{2+} pour déterminer la quantité de Ca^{2+} que peuvent accumuler les mitochondries avant le déclenchement de l'ouverture du PTP. Les résultats ont montré que la quantité de Ca^{2+} nécessaire pour induire l'ouverture du PTP était inférieure d'environ 40% dans les mitochondries de rats ACF comparativement aux mitochondries de rats contrôles en présence des substrats du complexe I (Figure 19). Comme la régulation du PTP est influencée par le type de substrats alimentant la chaîne respiratoire, les expériences ont été répétées avec les substrats du complexe II (succinate-rotenone). Bien que les mitochondries pouvaient accumuler environ deux fois plus de Ca^{2+} avant que l'ouverture du PTP ne soit observée, la différence entre les groupes expérimentaux persistait avec une capacité de rétention calcique d'environ 60% inférieure chez les mitochondries d'animaux ACF. De manière à savoir si cette vulnérabilité mitochondriale au stress se manifestait dans l'organe entier, des cœurs ont été soumis à une période d'ischémie-reperfusion *ex vivo* et l'ouverture du PTP a été mesurée *in situ* par la méthode de séquestration mitochondriale du déoxyglucose tritié (^3H -DOG) (26, 62, 114). L'incorporation de ^3H -DOG dans le compartiment mitochondrial durant la reperfusion était

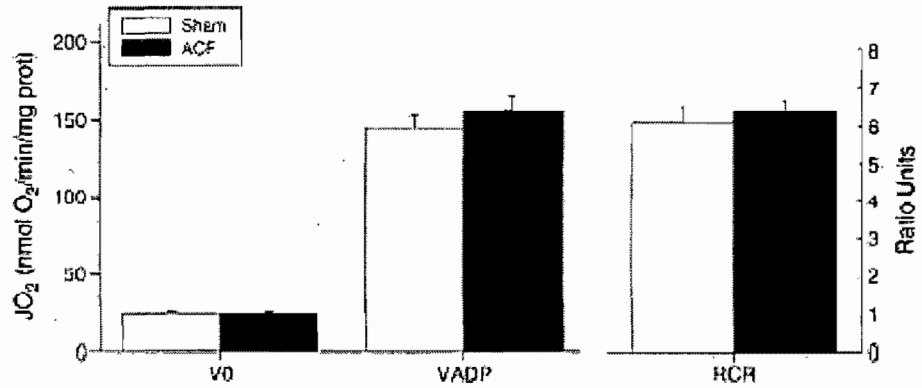


Figure 17 : Effet de la surcharge volumique sur la fonction basale des mitochondries cardiaques. La figure présente la respiration basale en absence d'ADP (V_0), la respiration maximale en présence de 1mM d'ADP (V_{ADP}) ainsi que le ratio RCR (V_{ADP}/V_0) mesuré sur des mitochondries cardiaques isolées 12 semaines après une chirurgie simulée (sham) ou de fistule aorto-cavale (ACF). Les mitochondries étaient énergisées avec les substrats du complexe I glutamate-malate (5 :2,5 mM). Les valeurs représentent la moyenne \pm S.E.M. pour un $n = 12$ dans chaque groupe. Adaptée de Marcil et al. (114).

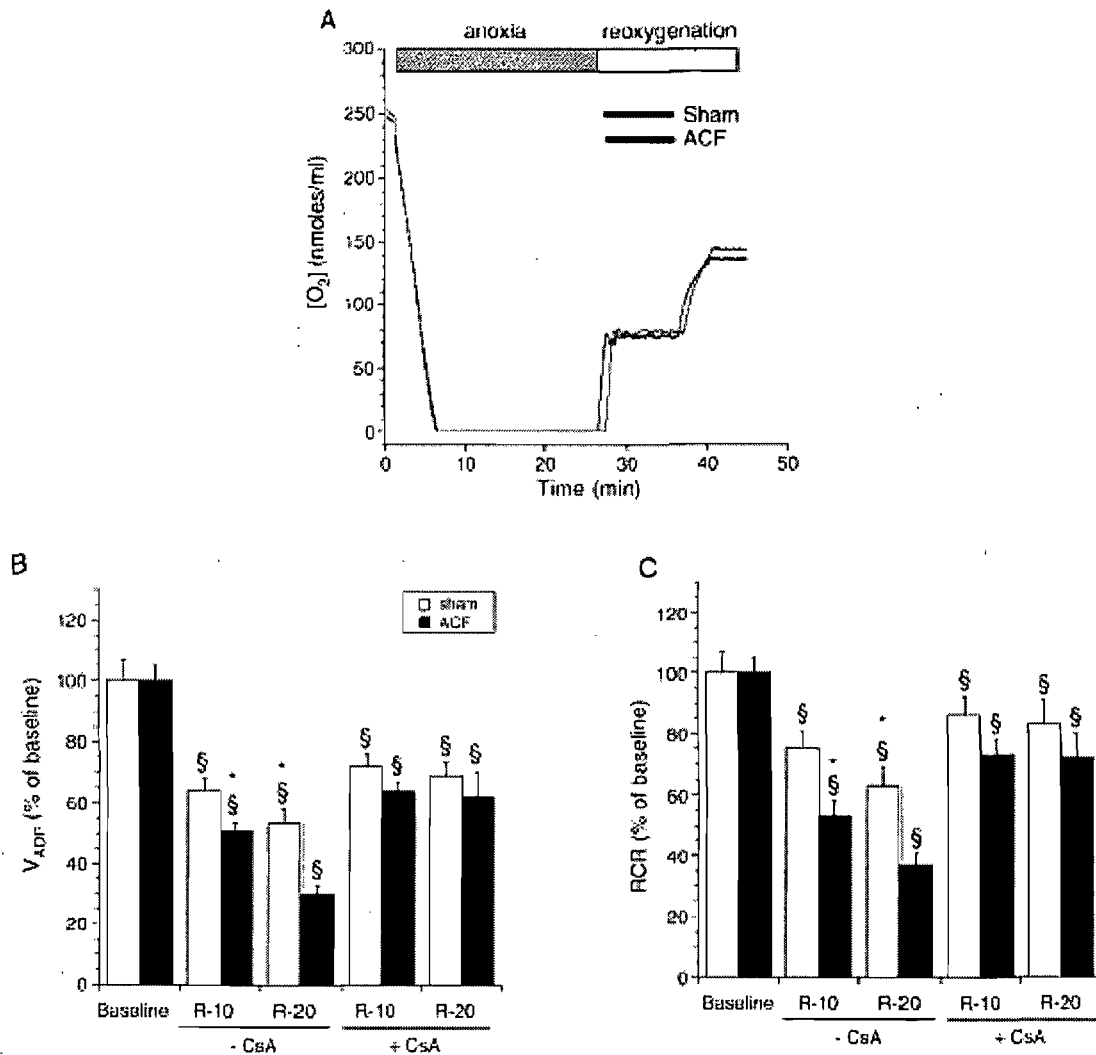


Figure 18 : Effet de la surcharge volumique sur la dysfonction respiratoire induite par une anoxie-réoxygénation *in vitro*. La figure A présente un enregistrement typique de la concentration en O₂ consommée par des mitochondries d'animaux contrôles et d'animaux ACF pendant une période d'anoxie-réoxygénation. Les valeurs obtenues pour V_{ADP} et le RCR à la 10^e et la 20^e minute de réoxygénation (figures B et C) sont exprimées en pourcentage des valeurs observées en absence de stress d'anoxie-réoxygénation (valeurs de bases). Les expériences ont été répétées en absence ou en présence de 1 μM de

cyclosporine A (CsA) ajouté avant le début de la période d'anoxie. Les valeurs représentent la moyenne \pm S.E.M. pour un $n = 12$ dans chaque groupe. § : Significativement différent de pré-anoxie dans le même groupe expérimental, ($P < 0,01$), * : Significativement différent du groupe contrôle dans les mêmes conditions expérimentales, ($P < 0,01$). Adaptée de Marcil et al. (114).

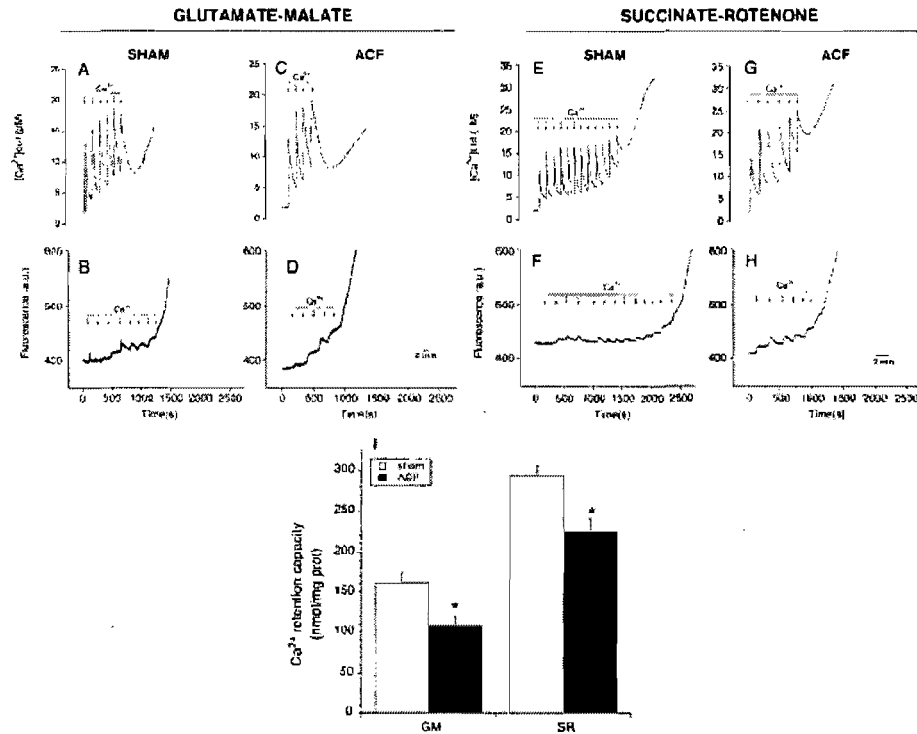


Figure 19 : Effet de la surcharge volumique sur la vulnérabilité à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique. La figure des cinétiques typiques de prise et de relâche du Ca^{2+} (A, C, E, et G) et du potentiel de membrane (B, D, F et H) obtenues sur les mitochondries d'animaux sham et ACF énergisées avec du glutamate-malate (5 :2,5 mM) ou du succinate (5mM) en présence de 1 μ M de roténone. Les tracés montrent l'accumulation progressive de Ca^{2+} suivie par sa relâche et l'effondrement simultané du potentiel de membrane. Chaque flèche indique l'addition d'une dose de Ca^{2+} de 42 μ mol/mg protéine. Le panneau I présente la capacité de rétention calcique calculée à partir de 8 à 10 expériences différentes dans chaque groupe. * : Significativement différent des contrôles, ($P < 0,05$). Adaptée de Marcil et al. (114).

significativement plus grande dans les cœurs ACF que dans les cœurs contrôles indiquant une augmentation de l'occurrence d'ouverture du PTP dans le cœur hypertrophié (Figure 20). De plus, ces résultats étaient associés à une récupération des fonctions cardiaques inférieure chez les cœurs ACF (Figure 21). Enfin, les cœurs d'animaux ACF affichaient une plus grande relâche de l'enzyme lactate déshydrogénase mesurée dans le perfusât, indiquant un plus grand dommage tissulaire comparativement aux cœurs contrôles (Figure 20).

À notre connaissance, ces résultats ont fourni la première démonstration que les mitochondries développent une vulnérabilité au stress induisant l'ouverture du PTP au cours de la phase compensée de l'hypertrophie, au moment où aucune dysfonction systolique et aucune anomalie respiratoire n'est détectable. Ces données supportent donc l'idée que l'ouverture du PTP pourrait jouer un rôle causal dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Cependant, les mécanismes responsables de cette vulnérabilité demeurent encore inconnus et leur étude a fait l'objet du présent travail expérimental. De manière plus précise, nous avons déterminé si cette vulnérabilité était associée à une modification de l'expression et de la localisation de la cyclophiline-D ainsi qu'à une augmentation de la production de radicaux libres par la chaîne respiratoire et des contenus endogènes mitochondriaux de Ca^{2+} , trois importants modulateurs du PTP.

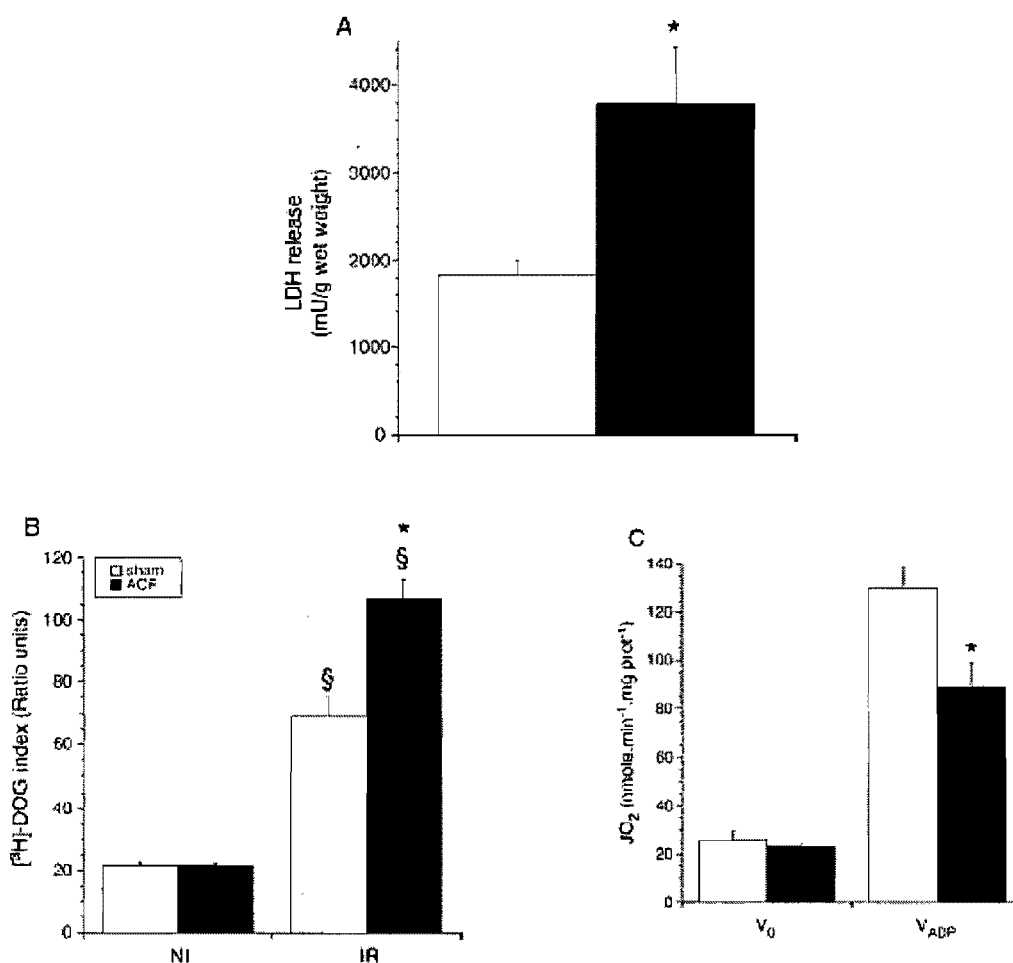


Figure 20 : Relâche de la lactate déshydrogénase (LDH) et la séquestration mitochondriale du ^3H -DOG mesurées dans les groupes contrôles et ACF. La figure A présente l'aire sous la courbe de la relâche de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le perfusât durant la reperfusion. La relâche de LDH est calculée en multipliant la valeur du débit (en mL/min/g de tissus frais) par la concentration en LDH (en mU/min/g de tissus frais). La figure B montre l'index de séquestration du ^3H -DOG exprimé comme le ratio de la désintégration par minute (DPM) de la fraction mitochondriale sur la DPM du tissu chez les cœurs n'ayant pas été soumis à une ischémie ($n = 4$ dans chaque groupe) et chez les cœurs ayant subi une ishémie-reperfusion ($n = 9$ et $n = 8$ pour contrôles et ACF

respectivement). La figure C montre la respiration basale (V_0) et la respiration maximale stimulée par l'ADP (V_{ADP}) mesurées sur les mitochondries isolées immédiatement après la perfusion du cœur entier. Adaptée de Marcil et al. (114).

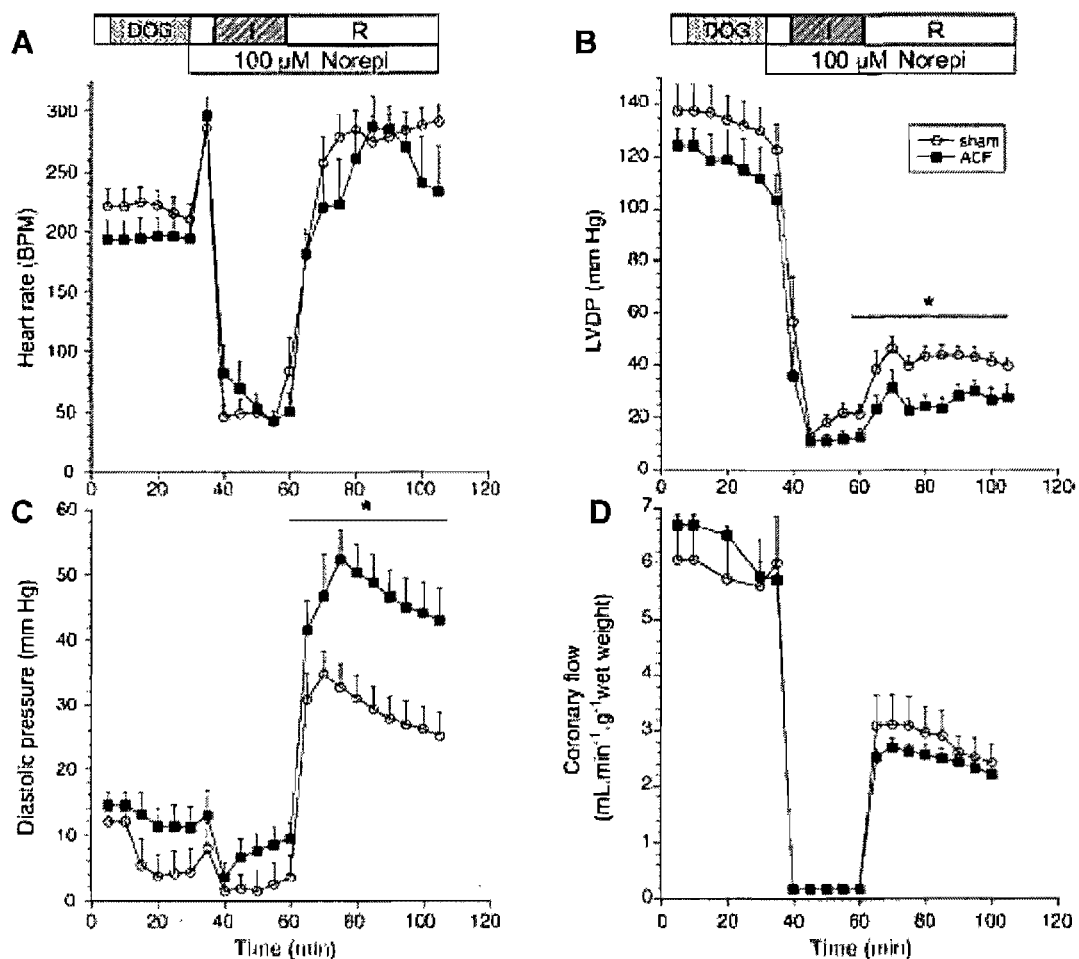


Figure 21 : Réponse du myocarde à un stress d'ischémie-reperfusion *ex vivo* chez des animaux contrôles et ACF. La figure montre l'évolution (A) de la fréquence cardiaque (BPM), (B) de la pression développée par le ventricule gauche (LVDP), (C) de la pression diastolique et (D) du débit coronarien des cœurs Sham et ACF soumis à une ischémie à faible débit (3% du débit coronaire pré-ischémique) avec présence d'un stress adrénergique (100 μ M noradrénaline). Par souci de clarté, les valeurs obtenues pour les cœurs qui n'ont pas été soumis à une ischémie-reperfusion ($n=4$ dans chacun des groupes) et qui ont servi à déterminer les valeurs basales de distribution du ^3H -DOG ne sont pas représentées. Après une période initiale de 10min de stabilisation, les cœurs étaient perfusés avec un tampon

contenant du ^3H -DOG. Cinq minutes avant l'ischémie, les cœurs étaient perfusés avec du tampon sans radioactivité pour éliminer le ^3H -DOG extracellulaire. Durant cette phase, l'infusion de norépinéphrine ($100\mu\text{M}$) était amorcée et maintenue pour le reste de la perfusion. La LVDP était la différence calculée entre les pressions systolique et diastolique.
* : Significativement différent des Sham, $p < 0,05$. Adaptée de Marcil et al. (114).

Bibliographie

1. Adrain C, Creagh EM, and Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *Embo J* 20: 6627-6636, 2001.
2. 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.
3. Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, and Martinou JC. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 276: 11615-11623, 2001.
4. Appaix F, Guerrero K, Rampal D, Izikki M, Kaambre T, Sikk P, Brdiczka D, Riva-Lavieille C, Olivares J, Longuet M, Antonsson B, and Saks VA. Bax and heart mitochondria: uncoupling and inhibition of respiration without permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1556: 155-167, 2002.
5. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, and Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* 22: 4385-4399, 2003.
6. 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: 658-662, 2005.
7. 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.
8. Baines CP, and Molkentin JD. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38: 47, 2005.
9. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, and Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41: 899-906, 1985.
10. 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.

11. 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.
12. Benderdour M, Charron G, Comte B, Ayoub R, Beaudry D, Foisy S, Deblois D, and Des Rosiers C. Decreased cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2122-2131, 2004.
13. Benjamin EJ, and Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci* 317: 168-175, 1999.
14. 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-H16, 2005.
15. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79: 1127-1155, 1999.
16. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, and Forte MA. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *Febs J* 273: 2077-2099, 2006.
17. Bowsher CG, and Tobin AK. Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids. *J Exp Bot* 52: 513-527, 2001.
18. Brady NR, Hamacher-Brady A, and Gottlieb RA. Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors. *Biochim Biophys Acta* 1757: 667-678, 2006.
19. Broekemeier KM, and Pfeiffer DR. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by cyclosporin A during long time frame experiments: relationship between pore opening and the activity of mitochondrial phospholipases. *Biochemistry* 34: 16440-16449, 1995.
20. 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. *J Mol Cell Cardiol* 33: 69-82, 2001.
21. Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M, and Dubinsky JM. Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J Neurosci* 23: 4858-4867, 2003.

22. Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, and Wiegand V. Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 11: 509-516, 1990.
23. Burri L, Strahm Y, Hawkins CJ, Gentle IE, Puryer MA, Verhagen A, Callus B, Vaux D, and Lithgow T. Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* 16: 2926-2933, 2005.
24. Byrne JA, Grieve DJ, Cave AC, and Shah AM. Oxidative stress and heart failure. *Arch Mal Coeur Vaiss* 96: 214-221, 2003.
25. Chauvin C, De Oliveira F, Ronot X, Mousseau M, Leverve X, and Fontaine E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem* 276: 41394-41398, 2001.
26. 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. *Mol Cell Biochem* 2006.
27. 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.
28. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, and Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345: 50-54, 1994.
29. Connern CP, and Halestrap AP. Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J* 284 (Pt 2): 381-385, 1992.
30. Connern CP, and Halestrap AP. 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. *Biochem J* 302 (Pt 2): 321-324, 1994.
31. 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.
32. Cory S, and Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2: 647-656, 2002.

33. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249., 1999.
34. Crompton M, and Andreeva L. On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 88: 513-523, 1993.
35. Crompton M, and Costi A. A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-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.
36. Crompton M, Costi A, and Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 245: 915-918, 1987.
37. Crompton M, Ellinger H, and Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 255: 357-360, 1988.
38. Crompton M, Virji S, and Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* 258: 729-735, 1998.
39. Crow MT, Mani K, Nam YJ, and Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 95: 957-970, 2004.
40. Csukly K, Ascah A, Matas J, Gardiner PF, Fontaine E, and Burelle Y. Muscle denervation promotes opening of the permeability transition pore and increases the expression of cyclophilin D. *J Physiol* 574: 319-327, 2006.
41. Czerski L, and Nunez G. Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? *J Mol Cell Cardiol* 37: 643-652, 2004.
42. Danial NN, and Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219, 2004.
43. Dart CH, Jr., and Holloszy JO. Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization. *Circ Res* 25: 245-253, 1969.
44. De Giorgi F, Lartigue L, Bauer MK, Schubert A, Grimm S, Hanson GT, Remington SJ, Youle RJ, and Ichas F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *Faseb J* 16: 607-609, 2002.

45. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, Ichas F, Korsmeyer SJ, Antonsson B, Jonas EA, and Kinnally KW. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* 16: 2424-2432, 2005.
46. Detaille D, Guigas B, Chauvin C, Batandier C, Fontaine E, Wiernsperger N, and Leverve X. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes* 54: 2179-2187, 2005.
47. Dhalla AK, Hill MF, and Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 506-514, 1996.
48. Dhalla AK, and Singal PK. Antioxidant changes in hypertrophied and failing guinea pig hearts. *Am J Physiol* 266: H1280-1285, 1994.
49. Di Lisa F. Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury. *IUBMB Life* 52: 255-261, 2001.
50. Di Lisa F, and Bernardi P. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 70: 191-199, 2006.
51. Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42, 2000.
52. Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* 516 (Pt 1): 1-17, 1999.
53. Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, and Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 27: 1790-1794, 1993.
54. Dzeja PP, and Terzic A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 206: 2039-2047, 2003.
55. Eliseev RA, Filippov G, Velos J, VanWinkle B, Goldman A, Rosier RN, and Gunter TE. Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition. *Neurobiol Aging* 28: 1532-1542, 2007.
56. Frey N, and Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65: 45-79, 2003.

57. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, and Pelicci PG. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122: 221-233, 2005.
58. Gomez L, Chavanis N, Argaud L, Chalabreysse L, Gateau-Roesch O, Ninet J, and Ovize M. Fas-independent mitochondrial damage triggers cardiomyocyte death after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2153-2158, 2005.
59. Gonzalez F, Pariselli F, Dupaigne P, Budihardjo I, Lutter M, Antonsson B, Dirolez P, Manon S, Martinou JC, Gubern M, Wang X, Bernard S, and Petit PX. tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax and Bak. *Cell Death Differ* 12: 614-626, 2005.
60. Goto Y, Yoshikane H, Honda M, Morioka S, Yamori Y, and Moriyama K. Three-dimensional observation on sarcoplasmic reticulum and caveolae in myocardium of spontaneously hypertensive rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* 22: 535-542, 1990.
61. Green DR, and Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629, 2004.
62. Griffiths EJ, and Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 307 (Pt 1): 93-98, 1995.
63. Guarnieri C, Muscari C, and Caldarera CM. Oxygen radicals and tissue damage in heart hypertrophy. *Adv Myocardiol* 5: 191-199, 1985.
64. Gulbins E, Dreschers S, and Bock J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 88: 85-90, 2003.
65. Halestrap A. Biochemistry: a pore way to die. *Nature* 434: 578-579, 2005.
66. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 34: 232-237, 2006.
67. 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.
68. Halestrap AP, and Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268: 153-160, 1990.

69. Halestrap AP, McStay GP, and Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166, 2002.
70. 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.
71. HaS. The growing burden of heart disease and stroke in Canada 2003.
72. Haworth RA, and Hunter DR. Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J Membr Biol* 54: 231-236, 1980.
73. Haworth RA, and Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys* 195: 460-467, 1979.
74. He L, and Lemasters JJ. Heat shock suppresses the permeability transition in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 278: 16755-16760, 2003.
75. 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.
76. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, and Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277: 432-438, 2002.
77. Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, 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.
78. Hill MF, and Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 148: 291-300, 1996.
79. Hill MF, and Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation* 96: 2414-2420, 1997.
80. Hunter DR, and Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 195: 453-459, 1979.

81. Hunter DR, and Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys* 195: 468-477, 1979.
82. Hunter DR, Haworth RA, and Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 251: 5069-5077, 1976.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. Jiang X, and Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* 73: 87-106, 2004.
89. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, and Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410: 549-554, 2001.
90. Kang PM, and Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med* 9: 177-182, 2003.
91. 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.

92. Kantor PF, Dyck JR, and Lopaschuk GD. Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart. *Am J Med Sci* 318: 3-14, 1999.
93. Katz AM. Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther* 16: 245-249, 2002.
94. Kelekar A, and Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8: 324-330, 1998.
95. 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.
96. Kim JS, Jin Y, and Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H2024-2034, 2006.
97. Kinnally KW, and Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 12: 857-868, 2007.
98. 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.
99. 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.
100. Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, and Schaper J. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92: 715-724, 2003.
101. Kostuk WJ. Congestive heart failure: what can we offer our patients? *Cmaj* 165: 1053-1055, 2001.
102. Kowaltowski AJ, Castilho RF, and Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495: 12-15, 2001.
103. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, and Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757: 590-595, 2006.

104. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, and Flavell RA. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311: 847-851, 2006.
105. 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.
106. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, and Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2: 183-192, 2002.
107. Li LY, Luo X, and Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99, 2001.
108. Li YY, Chen D, Watkins SC, and Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 104: 2492-2497, 2001.
109. Li YY, Maisch B, Rose ML, and Hengstenberg C. Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2699-2709, 1997.
110. 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.
111. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, and Levy D. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106: 3068-3072, 2002.
112. Long X, Goldenthal MJ, Wu GM, and Marin-Garcia J. Mitochondrial Ca²⁺ flux and respiratory enzyme activity decline are early events in cardiomyocyte response to H₂O₂. *J Mol Cell Cardiol* 37: 63-70, 2004.
113. Mackenzie S, and McIntosh L. Higher plant mitochondria. *Plant Cell* 11: 571-586, 1999.
114. Marcil M, Ascah A, Matas J, Bélanger S, Deschepper CF, and Burelle Y. Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in absence of stress. *J Mol Cell Cardiol* in press: 2006.
115. Marin-Garcia J, and Goldenthal MJ. Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review. *J Card Fail* 8: 347-361, 2002.

116. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont EM, Ananthakrishnan R, and Perez-Atayde A. Is age a contributory factor of mitochondrial bioenergetic decline and DNA defects in idiopathic dilated cardiomyopathy? *Cardiovasc Pathol* 8: 217-222, 1999.
117. Marin-Garcia J, Hu Y, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Pierpont GL, and Goldenthal MJ. A point mutation in the cytb gene of cardiac mtDNA associated with complex III deficiency in ischemic cardiomyopathy. *Biochem Mol Biol Int* 40: 487-495, 1996.
118. Martin AG, and Fearnhead HO. Apocytochrome c blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 50834-50841, 2002.
119. Martin AG, Nguyen J, Wells JA, and Fearnhead HO. Apo cytochrome c inhibits caspases by preventing apoptosome formation. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 944-950, 2004.
120. Mazat JP, Letellier T, Bedes F, Malgat M, Korzeniewski B, Jouaville LS, and Morkuniene R. Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies. *Mol Cell Biochem* 174: 143-148, 1997.
121. McStay GP, Clarke SJ, and Halestrap AP. Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 367: 541-548, 2002.
122. Mitchell P, and Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213: 137-139, 1967.
123. Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, and Feng Q. In vivo TNF- α inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1813-1820, 2004.
124. 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.
125. Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR, and Molkentin JD. Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* 117: 2431-2444, 2007.
126. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8144-8149, 1999.
127. 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.
128. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, and Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* 307 (Pt 1): 99-106, 1995.
129. 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.
130. 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.
131. Precht TA, Phelps RA, Linseman DA, Butts BD, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, and Heidenreich KA. The permeability transition pore triggers Bax translocation to mitochondria during neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 12: 255-265, 2005.
132. Rasola A, and Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12: 815-833, 2007.
133. Rathmell JC, and Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 17: 781-828, 1999.
134. Regula KM, and Kirshenbaum LA. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *J Mol Cell Cardiol* 38: 3-13, 2005.
135. Robert V, Gurlini P, Tosello V, Nagai T, Miyawaki A, Di Lisa F, and Pozzan T. Beat-to-beat oscillations of mitochondrial $[Ca^{2+}]$ in cardiac cells. *Embo J* 20: 4998-5007, 2001.
136. Sabbah HN, Sharov VG, and Goldstein S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 5: 131-138, 2000.
137. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, and Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874, 2004.
138. Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, and Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* 7: 161-173, 2002.

139. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, and Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 29: 380-386, 1999.
140. Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, 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? *J Am Coll Cardiol* 39: 481-488, 2002.
141. Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE, and Holtz J. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 40: 2174-2181, 2002.
142. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, and Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 164-180, 2006.
143. Scorrano L, and Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 437-444, 2003.
144. Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, and Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32: 2361-2367, 2000.
145. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, and Singal PK. Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147: 77-81, 1995.
146. Siu PM, and Alway SE. Deficiency of the Bax gene attenuates denervation-induced apoptosis. *Apoptosis* 11: 967-981, 2006.
147. Siu PM, and Alway SE. Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *J Physiol* 565: 309-323, 2005.
148. 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.
149. Souzeau E, Llamas B, Belanger S, Picard S, and Deschepper CF. A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension* 47: 128-133, 2006.

150. Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, and Alnemri ES. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway. *J Biol Chem* 275: 36152-36157, 2000.
151. Stanley WC, and Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions? *Cardiovasc Res* 45: 805-806, 2000.
152. Stoner CD, Ressallat MM, and Sirak HD. Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts. *Circ Res* 23: 87-97, 1968.
153. 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.
154. Swynghedauw B, and Delcayre C. Biology of cardiac overload. *Pathobiol Annu* 12: 137-183, 1982.
155. Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM, and Crompton M. Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem* 238: 166-172, 1996.
156. Thoenes M, Forstermann U, Tracey WR, Bleese NM, Nussler AK, Scholz H, and Stein B. Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 28: 165-169, 1996.
157. Tsujimoto Y, Nakagawa T, and Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1757: 1297-1300, 2006.
158. Uren RT, Dewson G, Bonzon C, Lithgow T, Newmeyer DD, and Kluck RM. Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 280: 2266-2274, 2005.
159. van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA, and De Windt LJ. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* 67: 21-29, 2005.
160. Vanderluit JL, McPhail LT, Fernandes KJ, Kobayashi NR, and Tetzlaff W. In vivo application of mitochondrial pore inhibitors blocks the induction of apoptosis in axotomized neonatal facial motoneurons. *Cell Death Differ* 10: 969-976, 2003.
161. Voet DaV, J.G. *Biochimie*. Éditions De Boeck Université. 2005, p. 1505-1506.

162. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, and Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 62: 22-29, 2002.
163. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, and Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-730, 2001.
164. Weiss JN, Korge P, Honda HM, and Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 93: 292-301, 2003.
165. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, Shirani J, Armstrong RC, and Kitsis RN. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 111: 1497-1504, 2003.
166. Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, and Halestrap AP. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J* 336 (Pt 2): 287-290, 1998.
167. Zoratti M, and Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176., 1995.

CHAPITRE II

L'article de recherche dans sa version intégrale

Auteurs et leur contribution à l'étude

Jimmy Matas :

- Responsable du projet.
- Compilation et analyse des données.
- Rédaction de l'article.
- Isolation et purification de mitochondries.
- Isolation des fractions membranaires et solubles mitochondriales.
- Immunobuvardage des protéines : cyclophiline-D, VDAC, ANT, HSP60, GRP75 (dans différentes conditions).
- Dosage du calcium endogène mitochondrial.
- Mesure de la production de ROS par les mitochondries.
- Présentation des résultats à la 16^{ième} réunion annuelle *de La Société Québécoise de l'Hypertension Artérielle* (janvier 2008).

Mariannick Marcil

- Mesure de respiration mitochondriale
- Mesure de capacité de rétention calcique mitochondriale
- Mesure du potentiel de membrane mitochondriale

Alexis Ascah :

- Dosage de citrate synthase
- Aide technique générale

Christian F. Deschepper :

- Élevage de la colonie de rats WKHA
- Révision de l'article

Yan Burelle :

- Responsable du projet
- Supervision du projet
- Rédaction de l'article

Compensated cardiac hypertrophy is associated with increased cyclophilin-d binding and vulnerability to permeability transition pore opening.

Jimmy Matas¹, Mariannick Marcil¹, Alexis Ascah¹, Christian F. Deschepper² and Yan Burelle¹

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: Permeability transition pore 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

The goal of the present study was to investigate the mechanisms involved in the development of vulnerability to permeability transition pore (PTP) opening in the hypertrophied but compensated heart. Hypertrophy was induced by an aorto-caval fistula (ACF) in WKHA rats. Mitochondria were isolated 12 weeks post-surgery for measurement of respiratory function, PTP sensitivity to Ca^{2+} , ROS production, endogenous matrix Ca^{2+} and expression/localization of the PTP regulating protein Cyp-D. Sensitivity to Ca^{2+} -induced PTP opening was increased in ACF vs sham in absence of basal respiratory dysfunctions. Total expression of Cyp-D and the membrane/soluble ratio was greater in the ACF group. Increased membrane binding of Cyp-D, which is known to facilitate PTP opening, was not reversed by *in vitro* incubation with high levels of the PTP inhibitor and Cyp-D ligand CsA prior to the Ca^{2+} challenge. ACF mitochondria also displayed a slight elevation of endogenous matrix Ca^{2+} and produced more ROS *in vitro*, which is known to favor the recruitment of Cyp-D from the soluble to the membrane fraction. These results suggest that early modifications of key PTP regulators, including an increase in Cyp-D expression and membrane recruitment, contribute to the development of mitochondrial vulnerability in the hypertrophied heart. Those changes may predispose compensated hypertrophied hearts to further cellular dysfunction, ultimately leading to the activation of cell death typically observed in the transition to heart failure.

Keywords: hypertrophy, permeability transition pore, cyclophilin-D, oxidative stress, heart failure

Introduction

Among factors potentially involved in the pathogenesis of heart failure, mitochondria have been the subject of several studies as they may play a central role in energy starvation and are an important source of potentially damaging reactive oxygen species (ROS). It has been reported that systolic heart failure is accompanied by alterations in the ultrastructure and function of mitochondria, including a reduction in the activity of respiratory chain enzymes and the capacity for oxidative phosphorylation, and an increase in the production of ROS and mtDNA mutations (Sabbah *et al.*, 1992; Marin-Garcia *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Marin-Garcia *et al.*, 1999; Jarreta *et al.*, 2000; Sharov *et al.*, 2000; Ide *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Ozcan *et al.*, 2003). In addition, a growing body of experimental evidence clearly indicates that mitochondria also contribute to the ongoing cell death observed in the failed myocardium via an increase in the permeability of their membranes (Sharov *et al.*, 2005; Javadov & Karmazyn, 2007), which results in the release of pro-apoptotic factors in the cytoplasm (Olivetti *et al.*, 1997; Narula *et al.*, 1999; Moe *et al.*, 2002; Scheubel *et al.*, 2002a; Scheubel *et al.*, 2002b). This latter phenomenon is important since excessive loss of cardiomyocytes is currently viewed as an important component that contributes to cardiac decompensation (Regula & Kirshenbaum, 2005; van Empel *et al.*, 2005). However, these changes were all observed in hearts that had already reached end-stage failure, which makes it difficult to differentiate early mitochondrial dysfunctions that may be causal in the progression toward decompensation from those that are late consequence of the failure process.

In a recent study, we have provided *in vitro* and *in situ* evidence that an increase in the vulnerability of mitochondria to opening of the permeability transition pore (PTP), a critical permeation event that activates necrosis and apoptosis, develops in the hypertrophied heart when submitted to acute stress (Marcil *et al.*, 2006a). Moreover, this

phenomenon occurs at a time when systolic function is normal and in absence of typical respiratory impairments associated with heart failure (Marcil *et al.*, 2006a), which indicates that an alteration in the regulation of PTP opening can precede overt mitochondrial defects.

The open-close transition of the PTP is subject to a complex regulation by several physiological effectors. Accumulation of Ca^{2+} in the matrix is an essential trigger of pore opening (Zoratti & Szabo, 1995; Bernardi, 1999). Several factors, including the type of respiratory substrate used, membrane potential, redox state of pyridine nucleotides, reactive oxygen species, [adenylates] and [proton] can however act as co-regulators by affecting the sensitivity of the pore to Ca^{2+} (Zoratti & Szabo, 1995; Bernardi, 1999). In addition, cyclophilin-D (Cyp-D), a chaperone-like protein of the immunophilins family located in the mitochondrial matrix, also acts as a potent PTP sensitizer by binding to putative pore components of the inner membrane (Crompton, 1999; Halestrap *et al.*, 2002). However, the question of which of these factors contribute to the abnormal susceptibility to pore opening in the hypertrophied heart remains unclear.

In the present study, we used our model of hypertrophic cardiac remodeling induced by an aorto-caval fistula (ACF) (Marcil *et al.*, 2006a; Souzeau *et al.*, 2006) to investigate the relationship between mitochondrial vulnerability to PTP opening and changes in some of its physiological modulators. In particular, we hypothesized that increased Cyp-D expression and/or recruitment to membrane occurs during the remodeling process and may cause mitochondrial vulnerability.

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 that heart failure did not occur before 32 weeks of ACF in this strain and that 12 weeks after surgery, eccentric hypertrophy developed in a reliable and reproducible fashion, and in the absence of systolic dysfunction (Souzeau *et al.*, 2006).

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 (Garcia & Diebold, 1990). 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, as well as 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 (Marcil *et al.*, 2006a). 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(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid (EGTA), pH 7.2) 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 sec 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, 0.05 EGTA, 10 Tris-HCl, pH 7.2) and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. After repeating this washing step twice, the final mitochondrial pellet was re-suspended 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.

Mitochondrial respiratory function:

Mitochondria (0.3 mg of protein) were incubated in 1 ml of buffer containing (in mM): 110 KCl, 5 KH₂PO₄, 10 MOPS, 5 glutamate and 2.5 malate (pH 7.4). After performing basal ADP-restricted measurements (V_0), 1 mM ADP was added to measure the maximal rate of oxidative phosphorylation (V_{ADP}). Respiratory control ratio (RCR) was calculated as the ratio V_{ADP} / V_0 (Javadov *et al.*, 2005; Marcil *et al.*, 2006a).

Calcium challenge:

Mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated in 1.5 ml of buffer C (in mM: 250 sucrose, 10 MOPS, 0.05 EGTA, 10 KH₂PO₄, pH 7.2) containing glutamate-malate (5:2.5 mM) or succinate + rotenone (5 mM, 1 μ M). 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. (Ichas *et al.*, 1997). 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 prot) were added at 2 min intervals until a Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} -release was observed. Calcium retention capacity (CRC) was taken as the total amount of Ca^{2+} accumulated by mitochondria prior to the Ca^{2+} pulse triggering Ca^{2+} release (Ichas *et al.*, 1997). Calcium uptake kinetics was determined in each experimental group by calculating the time required to achieve 50 % of uptake of the first two Ca^{2+} pulses (Marcil *et al.*, 2006b). 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 μM : excitation-emission, 503-525 nm) and measurements were performed as described by Emaus et al. (Emaus *et al.*, 1986). Mitochondrial release of Rhodamine 123 following uncoupling with 100 nM carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was taken as an index of membrane potential.

Mitochondrial ROS production:

Mitochondrial H_2O_2 production was measured with the probe Amplex red, which in presence of horseradish peroxidase (HRP), reacts with H_2O_2 in a 1:1 ratio to yield the stable fluorescent compound resofurin (excitation-emission, 563-587 nm) and molar equivalent of O_2 . Mitochondria (0.3 mg/ml) were incubated in 1.5 ml buffer D containing (in mM: 250 sucrose, 0.005 EGTA, 10 MOPS) supplemented with 1.2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of horseradish peroxidase (HRP) and 5 μM amplex red. Changes in fluorescence over time were measured in presence of substrates for complex I (glutamate-malate: 5:2.5 mM) or complex II (succinate: 5 mM). In each test, H_2O_2 production was measured in absence or presence of rotenone (1 μM) and antimycin-A (2 μM) to block complex I and III respectively. At the

end of each test 0.72 nmole of H₂O₂ were added as an internal standard to allow calculation of endogenous ROS production by the respiratory chain.

Endogenous Ca²⁺ content:

Mitochondria were isolated as described above except that all buffers were free of EGTA in order to avoid chelating Ca²⁺ (Csukly *et al.*, 2006). Mitochondrial pellets were diluted in 0.6 N HCl (1/10 w/v), homogenized with a polytron (2x10 sec at a setting of 3) and sonicated (2x10 sec at 40% of maximal power output). Following 30 min of incubation in boiling water, samples were centrifuged 5 min at 14 000 g and the supernatant was recovered. Ca²⁺ content in the supernatant was determined spectrophotometrically (VERSAmax, Molecular Devices) using an O-Cresolphthalein Complexone assay according the manufacturer's instructions (TECO Diagnostics, Anaheim, CA). Results were expressed in nmoles Ca²⁺/mg prot.

Mitochondrial fractionation and immuno-blotting:

Mitochondria were isolated as described above in buffer E (in mM: 250 sucrose, 20 MOPS, 2.0 EGTA, 2.0 ethylenediamine tetraacetic acid, 2.5 glutathione, pH 7.2) supplemented with 0.5 % BSA and in absence of nagarse. After the second washing step, mitochondria were resuspended in 1 mL of buffer E without BSA and layered onto 20mL of 30% Percoll (Sigma) as described by Broekmeier et al. (Broekemeier *et al.*, 1991). Following centrifugation at 50 000 x g for 30 min, the mitochondrial layer was recovered at the bottom of the tube and diluted in ~30mL with buffer E and centrifuged at 10 000 x g for 10 min. After repeating this washing step three additional times, the final mitochondrial pellet was re-suspended in 0.3ml of buffer E supplemented with leupeptin (2ug/mL), aprotinin (2ug/mL) and PMSF (0.5mM) to a protein concentration of ~20 mg/ml and stored at -80°C for subsequent use.

Mitochondrial membrane and soluble proteins were isolated according to Coorsenn et al (Butt & Coorsen, 2005) with some modifications. Mitochondrial samples were centrifuged at 14 000 x g for 10 min and the supernatant was discarded. The mitochondrial pellet was re-suspended in a hypotonic lysis medium (20mM HEPES, pH7.4) and sonicated (2x10 sec at 40% of maximal power output). An equal volume of 2x PBS was added to the homogenate to restore isotonicity followed by a centrifugation at 120 000 x g for 3h at 4°C using a Beckman Optima™ TLX Ultracentrifuge. The resulting supernatant containing the soluble mitochondrial proteins was recovered and immediately stored at -80°C. The pellet was re-suspended in 1x PBS and the centrifugation was repeated. Following this washing step the pellet, considered as the membrane fraction, was re-suspended in fresh 1x PBS and stored at -80°C. All steps were carried at 4°C with buffers containing 2ug/mL leupeptin, 2ug/mL aprotinin and 0.5mM PMSF.

The membrane and soluble mitochondrial fractions were concentrated by centrifuging with a Microcon YM-3 centrifugal filter unit (Millipore). Protein determinations were performed as described above and samples were prepared for SDS-PAGE by dilutions with reducing sample buffer followed by a 10 min immersion in near-boiling water. Twenty to fifty micrograms of protein were loaded in each lane and resolved on 10-15% polyacrylamide gels at room temperature. The gels were transferred to a PVDF membrane (Millipore). Equal sample loading was confirmed by Ponceau S stain (Sigma-Aldrich). The membrane was fixed for 10 min with 0.05% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBS-T) then blocked in 5% non fat milk in TBS-T at room temperature for 90min, and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in TBS-T with 5% BSA: anti-CypD (1:2000 dilution, Affinity Bioreagents), anti-VDAC (1:2000 dilution, Alexis Biochemicals) and anti-HSP60 and anti-

GRP-75 (1:1000 dilution Stressgen Bioreagents). Membranes were then incubated for 60 min at room temperature in secondary antibody solution (1:75000 to 1:200000 dilution, Jackson Immunoresearch). Bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham) with film exposure times ranging from 5 to 10 min. Films were scanned and bands quantified by ImagePro software.

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. 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

Morphometric measurements and mitochondrial respiratory function.

As shown in Table 1, 12 weeks of volume overload induced a substantial myocardial hypertrophy. Absolute heart weight and heart weight to tibial length ratio were significantly increased in ACF animals compared to their sham counterparts. Lung and liver weights were also significantly higher in the ACF group. However, none of the animals displayed ascites and nutmeg liver and no lethality was observed over the course of the study. The isolation yield of mitochondria was similar in the two experimental groups. Consistent with results previously obtained (Marcil *et al.*, 2006a), basal and maximal ADP-stimulated respiration, respiratory control ratio as well as membrane potential under basal non-phosphorylating conditions were similar in mitochondria from both experimental groups (Figure 1), indicating the absence of apparent respiratory defects at this stage of remodeling.

Ca²⁺ challenge:

Figure 2 presents the results of Ca²⁺ challenge experiments aimed to assess vulnerability to PTP opening. When energized with the complex I substrates glutamate-malate (GM), mitochondria from sham animals were able to accumulate 145 ± 11 nmol Ca²⁺/mg protein (n=7) before PTP-induced Ca²⁺ release was triggered. However, only 95 ± 12 nmol Ca²⁺/mg protein (n=7, P < 0.01) were required to trigger this effect in mitochondria from ACF animals. A similar phenomenon was also observed when mitochondria were energized with the complex II donor succinate (results not shown).

This vulnerability to PTP opening was not due to differences in the rate of Ca^{2+} uptake by mitochondria, as the average time to 50 % uptake calculated on the first two Ca^{2+} pulses of each Ca^{2+} challenge was similar in the two experimental groups (39 ± 1 and 39 ± 3 sec in sham and ACF respectively, $n=10$). However, it is noticeable that the endogenous Ca^{2+} levels present in mitochondria prior to the Ca^{2+} challenge was slightly higher in ACF compared to sham animals (9.8 ± 0.6 and 12.6 ± 1.3 nmol/mg protein in sham and ACF respectively, $n=7-9$, $P = 0.06$).

Reduction of membrane potential is known to sensitize mitochondria to pore opening in presence of Ca^{2+} levels that are insufficient *per se* to trigger permeability transition in well-polarized conditions (Bernardi *et al.*, 1992; Zoratti & Szabo, 1995; Fontaine *et al.*, 1998). Therefore, in addition to the assessment of $\Delta\Psi$ under baseline conditions (Figure 1), the amplitude of the depolarization associated with the electrophoretic uptake of Ca^{2+} was also assessed during the Ca^{2+} challenge. As shown in figure 3, the depolarization transients were similar in the two experimental groups. As expected, once PTP opening occurred, an abrupt and complete loss of $\Delta\Psi$ was observed. However, consistent with the calcium retention capacity data, significantly less Ca^{2+} was required to trigger this effect in mitochondria from ACF animals compared with sham.

Incubation of mitochondria with cyclosporin-A (CsA) is known to significantly delay PTP opening in response to a variety of triggers by interacting with Cyp-D in a way that diminishes its recruitment to the mitochondrial inner membrane and binding to putative PTP components (Connern & Halestrap, 1994). For this reason, Ca^{2+} challenge experiments were repeated in presence of CsA. As shown in Figure 2, CsA significantly increased calcium-retention capacity by 2.2-2.5 fold in both experimental groups. However, CsA did

not abolish the difference in calcium retention capacity between the two experimental groups (313 ± 22 and 228 ± 18 nmol Ca^{2+} /mg protein in sham and ACF respectively, $n=7$, $P<0.01$). These results therefore suggested that in mitochondria from ACF animals CsA was unable to fully prevent the sensitizing action of Cyp-D, or that vulnerability to pore opening was caused by a Cyp-D- independent mechanism.

Cyclophilin-D expression and sub-mitochondrial localization.

Figure 4 shows the results of immunoblot analysis of Cyp-D expression measured in the whole mitochondrial lysate. Cyp-D protein expression was 1.8 ± 0.1 fold higher ($P<0.001$) in mitochondria from ACF hearts compared to their sham counterparts. Because of the important role of Cyp-D recruitment to the inner membrane in sensitizing to pore opening, soluble and membrane fractions were purified from freshly isolated percoll-purified mitochondria. The effectiveness of the fractionation procedure was first determined using typical membrane (VDAC) and soluble (citrate synthase) protein markers. As shown in figure 5, VDAC and CS could only be detected in their respective fractions and no differences in their expression were observed between the sham and the ACF group. Cyp-D levels in the soluble fractions were also similar in the two experimental groups, while in contrast, the amount of Cyp-D recovered in the membrane fractions of ACF animals was 3.7 ± 0.8 fold higher ($P<0.01$) compared to their sham counterparts. Comparison of the two mitochondrial fractions for an equal amount of proteins loaded (Figure 5 bottom) nevertheless indicated that Cyp-D was mainly recovered in the soluble fraction (79 and 89 % of total Cyp-D in ACF and sham respectively), consistent with its predominant localization in the matrix (Connern & Halestrap, 1994, 1996).

In order to determine whether the altered expression and sub-mitochondrial localization of Cyp-D was accompanied by changes in other mitochondrial chaperones, the GRP-75 and HSP-60 abundance was assessed in the soluble and membrane fractions. As shown in figure 5, no significant differences were observed between the two experimental groups.

Cyp-D immunoblots were also performed in mitochondria that were pre-incubated with 1 or 5 μM CsA prior to the isolation of membranes in order to determine whether this would prevent the increased Cyp-D binding observed in the ACF group. Given the concentration of CypD present in normal heart mitochondria (45 pmol/mg prot: ((Connern & Halestrap, 1992; Crompton *et al.*, 1998; Eliseev *et al.*, 2007)) and the 80 % increase in CypD content observed in the ACF group, the highest concentration of CsA used (5 μM) was sufficient to give a 3 and 6 fold molar excess of CsA over CypD in sham and ACF respectively. As shown in Figure 6, the amount of membrane-associated Cyp-D remained 1.9 ± 0.1 fold greater ($P < 0.05$) in ACF vs sham animals following pre-treatment with 5 μM CsA as opposed to a difference of 3.7 ± 0.8 ($P < 0.01$) in its absence (Figure 5). A similar observation was also made following treatment with 1 μM CsA (results not shown), which is consistent with the inability of CsA to normalize the difference in calcium retention capacity between the sham and the ACF groups during the *in vitro* Ca^{2+} challenge (Figure 2).

Mitochondrial production of reactive oxygen species:

In vitro studies on liver mitochondria have shown that an oxidative stress induced by the potent pore sensitizer *terbutyl* hydroperoxide increases Cyp-D binding to the inner membrane (Connern & Halestrap, 1994). We therefore determined whether the production

of ROS was increased in mitochondria from ACF animals. As shown in figure 7, the rate of H₂O₂ production in presence of the complex II substrate succinate was $50 \pm 10\%$ higher ($P < 0.01$) in mitochondria from ACF animals compared to their sham counterparts. ROS production under this condition is known to occur at the level of complex I through reverse electron flow from complex II and in a lesser manner at the level of complex III (Turrens, 1997). Consistent with these data, addition of rotenone to block the electron backflow significantly reduced H₂O₂ production in both experimental groups. Moreover, the difference in H₂O₂ production between sham and ACF animals was no longer significant ($P = 0.16$) under this condition, suggesting that the FeS center of the complex I was the main site responsible for the increased ROS production in ACF animals. H₂O₂ production in presence of the complex I donors glutamate-malate was similar in both experimental groups, unless rotenone was added to increase its reduction state. In this condition, ROS production by complex I was $20 \pm 4\%$ higher ($P < 0.01$) in the ACF compared to sham (Figure 7).

Discussion

A variety of mitochondrial defects including enhanced PTP opening have been previously associated with heart failure (Sabbah *et al.*, 2000; Sharov *et al.*, 2000; Stanley & Hoppel, 2000; Li *et al.*, 2001; Marin-Garcia & Goldenthal, 2002; Ozcan *et al.*, 2003; Javadov *et al.*, 2005). However, it remains difficult to differentiate early mitochondrial dysfunctions that may be causal in the progression toward decompensation from those that are late consequences of the failure process. In the present study, we show that 12 weeks after the induction of volume-overload by an aorto-caval fistula mitochondria become abnormally susceptible to opening of the PTP while respiratory function remains unaltered. Importantly, this phenomenon is associated with a marked increase in the expression and membrane recruitment of the PTP regulating protein Cyp-D. Moreover, the production of reactive oxygen species, which are known to promote PTP opening and Cyp-D recruitment, was increased in mitochondria from ACF animals. On the other hand, little or no changes were observed for other parameters that affect PTP opening including membrane potential, rate of Ca^{2+} uptake and endogenous levels of matrix Ca^{2+} .

Permeability transition pore opening in hypertrophy and failure:

Enhanced susceptibility to PTP has been previously reported in pathological hypertrophic remodeling induced by cardiac-specific over-expression of $\text{TNF}\alpha$ in mice (Ozcan *et al.*, 2003), myocardial infarction in rats (Javadov *et al.*, 2005), and rapid pacing in dogs (Sharov *et al.*, 2007). However, similar to several other studies in which the PTP was not specifically investigated (Sabbah *et al.*, 1992; Marin-Garcia *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Marin-Garcia *et al.*, 1999; Jarreta *et al.*, 2000; Sharov *et al.*, 2000; Ide *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001), these data were obtained in hearts that had reached the failing stage at a time when mitochondria displayed ultrastructural defects, mtDNA mutations, reduced activity of respiratory chain complexes, and impaired ATP synthesis (Sharov *et al.*, 2000;

Ozcan *et al.*, 2003; Javadov *et al.*, 2005). Therefore, this made it difficult to determine whether the appearance of PTP susceptibility preceded that of other mitochondrial defects.

In the present study, we observed that mitochondria from ACF animals displayed normal respiratory function and membrane potential (Figure 1). This is consistent with our previous observations (Marcil *et al.*, 2006a) as well as with several studies in animals and humans reporting that chronic compensated hypertrophy without systolic dysfunction is associated with normal electron transport chain enzymology and respiratory capacity (Sobel *et al.*, 1967; Lindenmayer *et al.*, 1968; Stoner *et al.*, 1968; Dart & Holloszy, 1969; Sordahl *et al.*, 1973; Leichtweis *et al.*, 1996). However, despite the absence of apparent respiratory impairments, mitochondria isolated from ACF animals displayed a marked vulnerability to Ca^{2+} -induced PTP opening. Importantly, we have previously shown that this phenomenon also occurs *in situ* when hearts from ACF animals are submitted to whole-organ ischemia-reperfusion, and that it is accompanied by a poorer recovery of contractile function and enhanced tissue injury (Marcil *et al.*, 2006a). Our results thus indicate that vulnerability to PTP opening, which is manifested under conditions of acute stress, can occur prior to other mitochondrial defects reported once the heart has reached the failing stage.

Cyclophilin-D expression:

Cyclophilin-D is a mitochondrial protein of the immunophilin family composed of three other members that have an extra-mitochondrial distribution (Cyp-A, B and C) (Andreeva *et al.*, 1999). Like all cyclophilins, Cyp-D is classified as a molecular chaperone by virtue of its capacity to catalyze *cis-trans* isomerization of peptidyl-prolyl bonds (PPIase activity), an important step in protein folding (Andreeva *et al.*, 1999). Although the role of Cyp-D is not fully understood, a number of experimental evidences indicate that Cyp-D

expression influences the regulation of the PTP. Indeed, variations in Cyp-D expression levels across tissues correlate with the susceptibility of mitochondria isolated from these tissues to PTP opening (Brustovetsky *et al.*, 2003; Eliseev *et al.*, 2007). Studies using transgenic approaches also show that inactivation (Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Schinzel *et al.*, 2005; Nakayama *et al.*, 2007) and over-expression (Baines *et al.*, 2005) of the Cyp-D gene in mice respectively lead to inhibition and activation of PTP opening, with a corresponding protection or susceptibility to cell death. Finally, it is noticeable that deletion of the Cyp-D gene prevents hypertrophic remodeling, fibrosis and cell death in mice with chronic dysregulation of Ca^{2+} handling induced by overexpression of the $\beta_2\text{a}$ subunit of L-type Ca^{2+} channels (Nakayama *et al.*, 2007).

In the present study, we observed that Cyp-D expression in mitochondria from ACF animals was 80 % greater than in mitochondria from sham animals. Given that some cyclophilins are stress-inducible and cooperate with heat shock proteins including mitochondrial HSP's (Johnson & Toft, 1994; Rassow *et al.*, 1995; Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996) we measured the protein expression of GRP-75 and HSP-60 to determine whether enhanced expression of Cyp-D was part of a more general chaperone response. These HSP's were selected because changes in their expression have been reported in hearts in the failing stage and during septic stress (Tanonaka *et al.*, 2001; Tanonaka *et al.*, 2003; Toga *et al.*, 2007). However the content of these HSP's was similar in mitochondria from both experimental groups.

Cyclophilin-D recruitment to mitochondrial membranes:

It is generally accepted that recruitment of Cyp-D to the membrane is important in the regulation of PTP opening (see (Crompton, 1999; Halestrap *et al.*, 2002) for reviews).

Cyp-D is a water-soluble protein that is mainly localized in the matrix, with only small amounts being associated with membrane proteins under normal conditions (Connern & Halestrap, 1992; Tanveer *et al.*, 1996). However, *in vitro* studies indicate that recruitment of Cyp-D to the membrane is considerably increased when mitochondria are acutely exposed to stresses that enhance susceptibility to PTP opening such as oxidants (t-butyl hydroperoxide) (Connern & Halestrap, 1994) and thiol reagents (diamide and phenylarsine oxide) (Connern & Halestrap, 1994, 1996). Under these conditions, binding of Cyp-D is believed to induce conformational change of putative PTP components, which favors permeability transition (Crompton, 1999; Halestrap *et al.*, 2002). Importantly, the well-known PTP inhibitor cyclosporin-A desensitizes mitochondria to pore opening by binding Cyp-D and reducing its recruitment (Connern & Halestrap, 1994; Andreeva *et al.*, 1995; Connern & Halestrap, 1996; Tanveer *et al.*, 1996).

In the present study, it is noticeable that the enhanced expression of Cyp-D observed in mitochondria from ACF animals was also associated with a 3.8 fold increase in membrane-bound Cyp-D, while soluble Cyp-D levels were unchanged compared to sham. Importantly this phenomenon was observed in freshly isolated mitochondria that were not submitted to *in vitro* stress, which suggest that increased recruitment of Cyp-D in ACF animals was the result of conditions prevailing in mitochondria *in vivo*. We also observed that incubation of mitochondria with excess amount of CsA was apparently unable to abolish both the increased Cyp-D binding and the enhanced susceptibility to Ca^{2+} -induced PTP opening. The inability of CsA to fully dissociate Cyp-D has been reported previously (Szabo & Zoratti, 1991; Andreeva *et al.*, 1995; Tanveer *et al.*, 1996; Crompton *et al.*, 1998). Interestingly, Connern and Halestrap (1994) (Connern & Halestrap, 1994) also observed that CsA was unable to prevent Cyp-D binding *in vitro* if it was added after exposure to pore sensitizers (t-butyl hydroperoxide, diamide and phenylarsine oxide), presumably because of the very low dissociation half-life of Cyp-D from its membrane-

binding partners ($\sim 2.3 \times 10^{13}$ second). In contrast, CsA was effective at preventing Cyp-D recruitment when added prior to the pore inducers. In the present study a similar phenomenon could account for the fact that the presence of CsA during the *in vitro* Ca^{2+} challenge was able to delay PTP opening in both experimental groups but was unable to normalize the greater PTP sensitivity of the ACF animals. These data further support the hypothesis that conditions prevailing *in vivo* are likely responsible for the enhanced recruitment of Cyp-D in mitochondria in the volume-overloaded heart.

Other modulators of PTP sensitivity:

Because of the complex regulation of PTP opening, changes in other factors could also contribute to the vulnerability of ACF mitochondria including increased Ca^{2+} loading in the matrix, lower membrane potential and elevated production of ROS (Zoratti & Szabo, 1995; Bernardi, 1999). While the rate of Ca^{2+} uptake during the Ca^{2+} challenge was similar between the two groups, our results indicate that the endogenous matrix Ca^{2+} levels present at baseline were slightly higher in mitochondria from ACF animals compared to their sham counterparts. Whether this is caused by the alteration in cellular Ca^{2+} handling which occur during cardiac hypertrophy (Frey & Olson, 2003; Berenji *et al.*, 2005) remains unknown. However, this difference in endogenous Ca^{2+} probably had a marginal role to play in the present *in vitro* experiments as it accounted for $\sim 5\%$ of the difference in calcium retention capacity observed between mitochondria from sham and ACF animals during the Ca^{2+} challenge. As for membrane potential, our observation that it was similar in the two groups at baseline and in response to Ca^{2+} uptake suggest that it is not a contributing factor to the vulnerability of ACF mitochondria.

It is noticeable that the production of reactive oxygen species from complex I was significantly increased in mitochondria from ACF animals compared to their sham counterparts. Increased superoxide production from complex I has been reported in sub-mitochondrial particles from failing hearts (Ide *et al.*, 1999). However, to our knowledge, this had not been previously shown in hearts in the compensated stage of hypertrophy. There are other evidences suggesting the presence of oxidative stress in mitochondria from hypertrophied heart. Benderdour et al. (Benderdour *et al.*, 2003; Benderdour *et al.*, 2004) reported accumulation of the lipid peroxidation by product 4 hydroxynonenal (4-HNE) and subsequent inactivation of the mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in spontaneously hypertensive SHR rats prior to the development of hypertension. A similar phenomenon was also reported in Sprague-Dawley rats 14 days following abdominal aortic coarctation, indicating that this effect was not specific to the SHR model (Benderdour *et al.*, 2004). Together, these evidences suggest that conditions that promote oxidative stress-related mitochondrial dysfunctions may develop early during hypertrophic remodeling. Given the demonstrated role of exogenous oxidants in favoring Cyp-D binding *in vitro* (Connern & Halestrap, 1994), this could be a factor involved in the increased recruitment of Cyp-D to membranes observed in the heart of ACF animals.

Conclusion:

Taken together, the results from the present study confirms our previous observations (Marcil *et al.*, 2006a) 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. Although ablation of the Cyp-D gene was recently shown to prevent hypertrophic remodeling and heart failure (Nakayama et al., 2007), the present study provides the first demonstration that expression and membrane

recruitment of Cyp-D increases in a physiological model of overload-induced hypertrophy. 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 (Chien, 1999; Li *et al.*, 2002; Giordano, 2005), increased diastolic Ca^{2+} levels (Balke & Shorofsky, 1998; Yano *et al.*, 2005), and hypoxia and/or ischemia (Ozcan *et al.*, 2003; Giordano, 2005). Increased Cyp-D expression and binding, by predisposing mitochondria to permeability transition, may be important factors initiating a vicious circle of increased cellular dysfunction ultimately leading to the activation of cell death typically observed in the transition to heart failure.

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). The work of CFD is supported by CIHR grants MOP-64391 and MOP-74460.

References

- Andreeva L, Heads R & Green CJ. (1999). Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol* **80**, 305-315.
- Andreeva L, Tanveer A & Crompton M. (1995). Evidence for the involvement of a membrane-associated cyclosporin-A-binding protein in the Ca²⁺-activated inner membrane pore of heart mitochondria. *Eur J Biochem* **230**, 1125-1132.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J & Molkentin JD. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**, 658-662.
- Balke CW & Shorofsky SR. (1998). Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* **37**, 290-299.
- Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA & Bernardi P. (2005). Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* **280**, 18558-18561.
- Benderdour M, Charron G, Comte B, Ayoub R, Beaudry D, Foisy S, DeBlois D & Des Rosiers C. (2004). Decreased cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2122-2131.
- Benderdour M, Charron G, DeBlois D, Comte B & Des Rosiers C. (2003). Cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development. *J Biol Chem* **278**, 45154-45159.
- Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA & Hill JA. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H8-H16.
- Bernardi P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* **79**, 1127-1155.
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I & Zoratti M. (1992). Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem* **267**, 2934-2939.

Bose S, Weikl T, Bugl H & Buchner J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* **274**, 1715-1717.

Broekemeier KM, Schmid PC, Dempsey ME & Pfeiffer DR. (1991). Generation of the mitochondrial permeability transition does not involve inhibition of lysophospholipid acylation. Acyl-coenzyme A:l-acyllysophospholipid acyltransferase activity is not found in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **266**, 20700-20708.

Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M & Dubinsky JM. (2003). Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J Neurosci* **23**, 4858-4867.

Butt RH & Coorssen JR. (2005). Postfractionation for enhanced proteomic analyses: routine electrophoretic methods increase the resolution of standard 2D-PAGE. *J Proteome Res* **4**, 982-991.

Chien KR. (1999). Stress pathways and heart failure. *Cell* **98**, 555-558.

Connern CP & Halestrap AP. (1992). Purification and N-terminal sequencing of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase from rat liver mitochondrial matrix reveals the existence of a distinct mitochondrial cyclophilin. *Biochem J* **284** (Pt 2), 381-385.

Connern CP & Halestrap AP. (1994). 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. *Biochem J* **302** (Pt 2), 321-324.

Connern CP & Halestrap AP. (1996). Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to [Ca²⁺]. *Biochemistry* **35**, 8172-8180.

Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341** (Pt 2), 233-249.

Crompton M, Virji S & Ward JM. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem* **258**, 729-735.

Csukly K, Ascah A, Matas J, Gardiner PF, Fontaine E & Burelle Y. (2006). Muscle denervation promotes opening of the permeability transition pore and increases the expression of cyclophilin D. *J Physiol* **574**, 319-327.

Dart CH, Jr. & Holloszy JO. (1969). Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization. *Circ Res* **25**, 245-253.

Eliseev RA, Filippov G, Velos J, VanWinkle B, Goldman A, Rosier RN & Gunter TE. (2007). Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition. *Neurobiol Aging* **28**, 1532-1542.

Emaus RK, Grunwald R & Lemasters JJ. (1986). Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* **850**, 436-448.

Fontaine E, Ichas F & Bernardi P. (1998). A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* **273**, 25734-25740.

Freeman BC, Toft DO & Morimoto RI. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* **274**, 1718-1720.

Frey N & Olson EN. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* **65**, 45-79.

Garcia R & Diebold S. (1990). Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovasc Res* **24**, 430-432.

Giordano FJ. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* **115**, 500-508.

Halestrap AP, McStay GP & Clarke SJ. (2002). The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**, 153-166.

Ichas F, Jouaville LS & Mazat JP. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**, 1145-1153.

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N & Takeshita A. (2001). Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* **88**, 529-535.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K & Takeshita A. (1999). Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* **85**, 357-363.

Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F & Casademont J. (2000). Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **45**, 860-865.

Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L & Karmazyn M. (2005). NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**, 135-143.

Javadov S & Karmazyn M. (2007). 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.

Johnson JL & Toft DO. (1994). A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J Biol Chem* **269**, 24989-24993.

Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Chandwaney R, Parmelee DJ & Ji LL. (1996). Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart. *Acta Physiol Scand* **156**, 51-60.

Li J-M, Gall NP, Grieve DJ, Chen M & Shah AM. (2002). Activation of NADPH Oxidase During Progression of Cardiac Hypertrophy to Failure. *Hypertension* **40**, 477-484.

Li YY, Chen D, Watkins SC & Feldman AM. (2001). Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* **104**, 2492-2497.

Li YY, Maisch B, Rose ML & Hengstenberg C. (1997). Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology* **29**, 2699-2709.

Lindenmayer GE, Sordahl LA & Schwartz A. (1968). Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. *Circ Res* **23**, 439-450.

Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF & Burelle Y. (2006a). Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *Journal of molecular and cellular cardiology* **41**, 998-1009.

- Marcil M, Bourduas K, Ascah A & Burelle Y. (2006b). Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1549-1557.
- Marin-Garcia J & Goldenthal MJ. (2002). Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review. *J Card Fail* **8**, 347-361.
- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont EM, Ananthakrishnan R & Perez-Atayde A. (1999). Is age a contributory factor of mitochondrial bioenergetic decline and DNA defects in idiopathic dilated cardiomyopathy? *Cardiovasc Pathol* **8**, 217-222.
- Marin-Garcia J, Hu Y, Ananthakrishnan R, Pierpont ME, Pierpont GL & Goldenthal MJ. (1996). A point mutation in the cytb gene of cardiac mtDNA associated with complex III deficiency in ischemic cardiomyopathy. *Biochem Mol Biol Int* **40**, 487-495.
- Moe GW, Naik G, Konig A, Lu X & Feng Q. (2002). Early and persistent activation of myocardial apoptosis, bax and caspases: insights into mechanisms of progression of heart failure. *Pathophysiology* **8**, 183-192.
- Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR & Molkentin JD. (2007). Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* **117**, 2431-2444.
- 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 & Kharbada S. (1999). Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8144-8149.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC & Anversa P. (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* **336**, 1131-1141.
- Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL & Terzic A. (2003). Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **35**, 1161-1166.
- Rassow J, Mohrs K, Koidl S, Barthelmess IB, Pfanner N & Tropschug M. (1995). Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Mol Cell Biol* **15**, 2654-2662.

Regula KM & Kirshenbaum LA. (2005). Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end. *Journal of molecular and cellular cardiology* **38**, 3-13.

Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M & Goldstein S. (1992). Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* **24**, 1333-1347.

Sabbah HN, Sharov VG & Goldstein S. (2000). Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart failure reviews* **5**, 131-138.

Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D & Holtz J. (2002a). Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium: fragile balance of myocyte survival? *J Am Coll Cardiol* **39**, 481-488.

Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE & Holtz J. (2002b). Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* **40**, 2174-2181.

Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA & Korsmeyer SJ. (2005). Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12005-12010.

Sharov VG, Todor A, Khanal S, Imai M & Sabbah HN. (2007). 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.

Sharov VG, Todor AV, Imai M & Sabbah HN. (2005). 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**, 305-310.

Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S & Sabbah HN. (2000). Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* **32**, 2361-2367.

Sobel BE, Spann JF, Jr., Pool PE, Sonnenblick EH & Braunwald E. (1967). Normal Oxidative Phosphorylation in Mitochondria from the Failing Heart. *Circ Res* **21**, 355-364.

- Sordahl LA, McCollum WB, Wood WG & Schwartz A. (1973). Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am J Physiol* **224**, 497-502.
- Souzeau E, Llamas B, Belanger S, Picard S & Deschepper CF. (2006). A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension* **47**, 128-133.
- Stanley WC & Hoppel CL. (2000). Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions? *Cardiovasc Res* **45**, 805-806.
- Stoner CD, Ressallat MM & Sirak HD. (1968). Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts. *Circ Res* **23**, 87-97.
- Szabo I & Zoratti M. (1991). The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem* **266**, 3376-3379.
- Tanonaka K, Toga W, Takahashi M, Kawana K, Miyamoto Y, Yoshida H & Takeo S. (2003). Hsp70 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of poly(ADP-ribose) synthetase in the nucleus of adult rat cardiomyocytes. *Molecular and cellular biochemistry* **248**, 149-155.
- Tanonaka K, Yoshida H, Toga W, Furuhashi K & Takeo S. (2001). Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. *Biochemical and biophysical research communications* **283**, 520-525.
- Tanveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM & Crompton M. (1996). Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress. *Eur J Biochem* **238**, 166-172.
- Toga W, Tanonaka K & Takeo S. (2007). Changes in Hsp60 level of the failing heart following acute myocardial infarction and the effect of long-term treatment with trandolapril. *Biological & pharmaceutical bulletin* **30**, 105-110.
- Turrens JF. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* **17**, 3-8.
- van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA & De Windt LJ. (2005). Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res* **67**, 21-29.
- Yano M, Ikeda Y & Matsuzaki M. (2005). Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest* **115**, 556-564.

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

Table**Table 1**

Morphometric data for sham and ACF rats

	Sham	ACF
Body weight (g)	404 ± 19	438 ± 35†
Heart weight (mg)	1205 ± 95	1949 ± 296†
Lung weight (mg)	1199 ± 165	1756 ± 297†
Liver weight (g)	12.5 ± 0.7	15.1 ± 3.4†
Mitochondrial isolation yield (mg protein/g ventricle)	9.5	8.1
Heart weight/Tibial length (mg/mm)	3.06 ± 0.05	4.94 ± 0.18†
Lung weight/Tibial length (mg/mm)	3.06 ± 0.09	4.36 ± 0.17†
Liver weight/Tibial length (mg/mm)	31.96 ± 0.44	35,38 ± 1.07†

Values are means ±SEM for 37 and 42 sham and ACF animals respectively.

† Significantly different from sham (P<0.01).

Figure legends

Fig 1: Respiratory function and membrane potential. The top panels show representative respirometry tracings of mitochondria isolated from sham and ACF animals in presence of glutamate:malate (5:2.5mM). Basal (V_0), ADP-stimulated (V_{ADP}) and respiratory control ratio (RCR: V_{ADP}/V_0) values are shown for each group. Oxygen consumption is expressed in $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein. Bottom panel shows membrane potential ($\Delta\Psi$) measured with rhodamine 123 under basal non-phosphorylating in presence of glutamate-malate. Values represent mean \pm SEM for $n = 8-11$.

Figure 2: Sensitivity to Ca^{2+} -induced PTP opening. Typical Ca^{2+} kinetics (A-D) tracings of sham and ACF mitochondria energized with glutamate:malate (5:2.5 mM) in absence (A, C) or presence (B, D) of 1 μM CsA. Tracings show progressive Ca^{2+} accumulation followed by PTP-induced release of accumulated Ca^{2+} . Each spike indicates the addition of a calcium pulse of 42 nmol/mg of prot. Panel E shows mean values for Ca^{2+} retention capacity (CRC) computed from 7 independent preparations. a: Significantly different from sham $P < 0.05$, b: Significantly different from CRC in absence of CsA within each experimental group.

Figure 3: Changes in membrane potential in response to Ca^{2+} pulses. Figure shows representative traces of changes in $\Delta\Psi$ measured with rhodamine 123 during Ca^{2+} challenge experiments. Each depolarization transient corresponds to the addition of a calcium pulse of 42 nmol Ca^{2+} /mg protein.

Figure 4: Mitochondrial cyclophilin-D protein content. Representative immunoblots of cyclophilin D (CypD: 21 kDa) and voltage dependent anion channel (VDAC: 31 kDa) in

heart mitochondria isolated from sham and ACF animals. Each line represents a single mitochondrial preparation in each group. Densitometric analysis for each protein represents the mean \pm SEM of 6 preparations in each experimental group. VDAC content was similar in the two experimental groups and was thus used as a loading control. a : Significantly different from sham ($P < 0.05$).

Figure 5: Cyclophilin-D content in the soluble and membrane fraction. Top panels show representative immunoblots of Cyp-D and VDAC in the soluble (20 μ g/lane) and membrane (40 μ g/lane) fraction prepared from freshly isolated mitochondria. Cyp-D expression is normalized against VDAC and citrate synthase. Bottom panels show the results of similar experiments run of larger gels in which the amount of protein loaded was similar in the soluble and membrane fractions (50 μ g/lane). HSP60 and GRP-75 were unchanged between experimental in the soluble and membrane fractions confirming the equal protein loading.

Figure 6: Cyclophilin-D content in the membrane fraction following cyclosporin-A treatment. Representative immunoblots of mitochondrial CyD and VDAC in the soluble and membrane fraction prepared from freshly isolated mitochondria that were incubated with 5 μ M of cyclosporine-A for 15 minutes.

Figure 7: Effect of cardiac volume-overload on mitochondrial H₂O₂ production. Representative traces of H₂O₂ production in heart mitochondria of sham and ACF animals when energized with succinate (A) or glutamate-malate (B) are shown. Production of H₂O₂ was measured prior and following the addition of 1 μ M of rotenone in order to inhibit complex I. The rate of H₂O₂ production is indicated as nmoles/min/mg of protein. Panel C and D shows mean values for H₂O₂ computed from independent preparations (n = 8-9).

Panel C a: Significantly different from sham $P < 0.01$, b: Differences between each experimental group are no longer significant in absence of rotenone $P < 0.16$. Panel D b: Significantly different from sham in presence of rotenone $P < 0.01$.

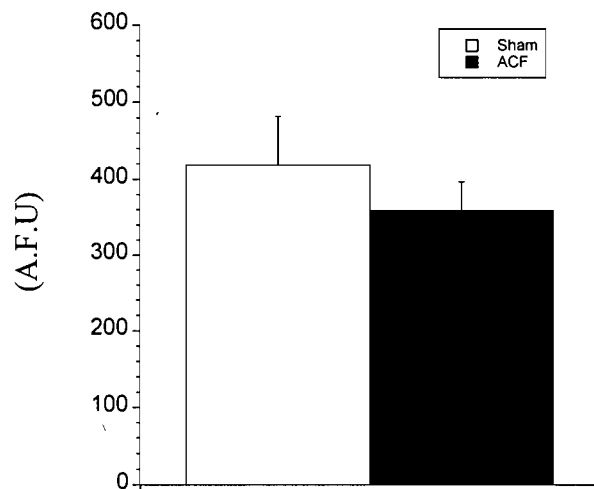
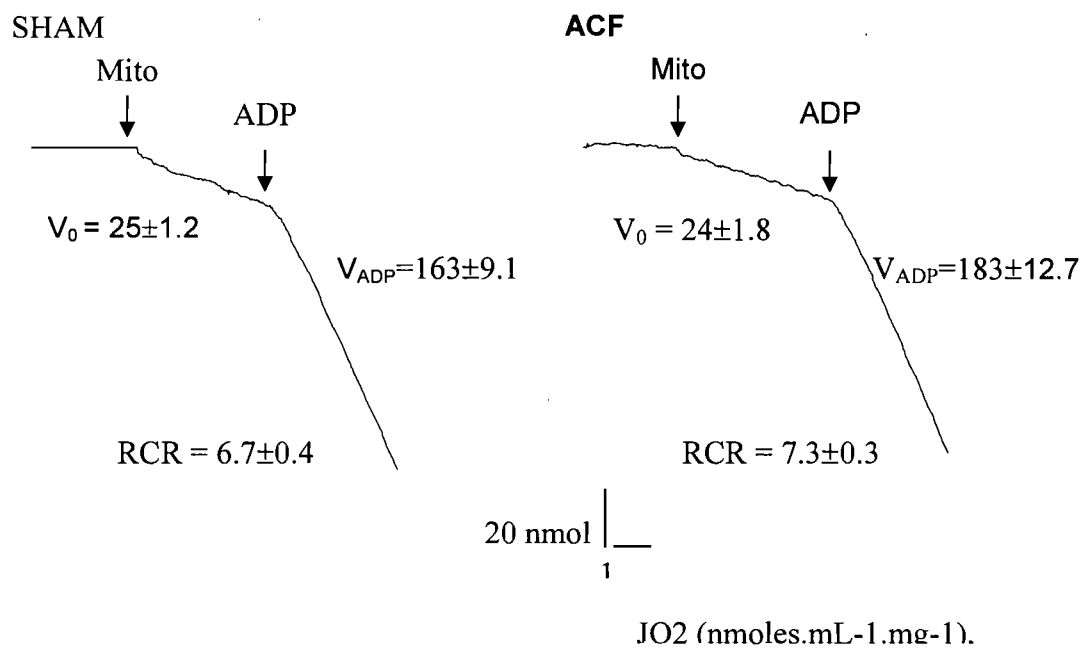
Figures**Figure 1**

Figure 2

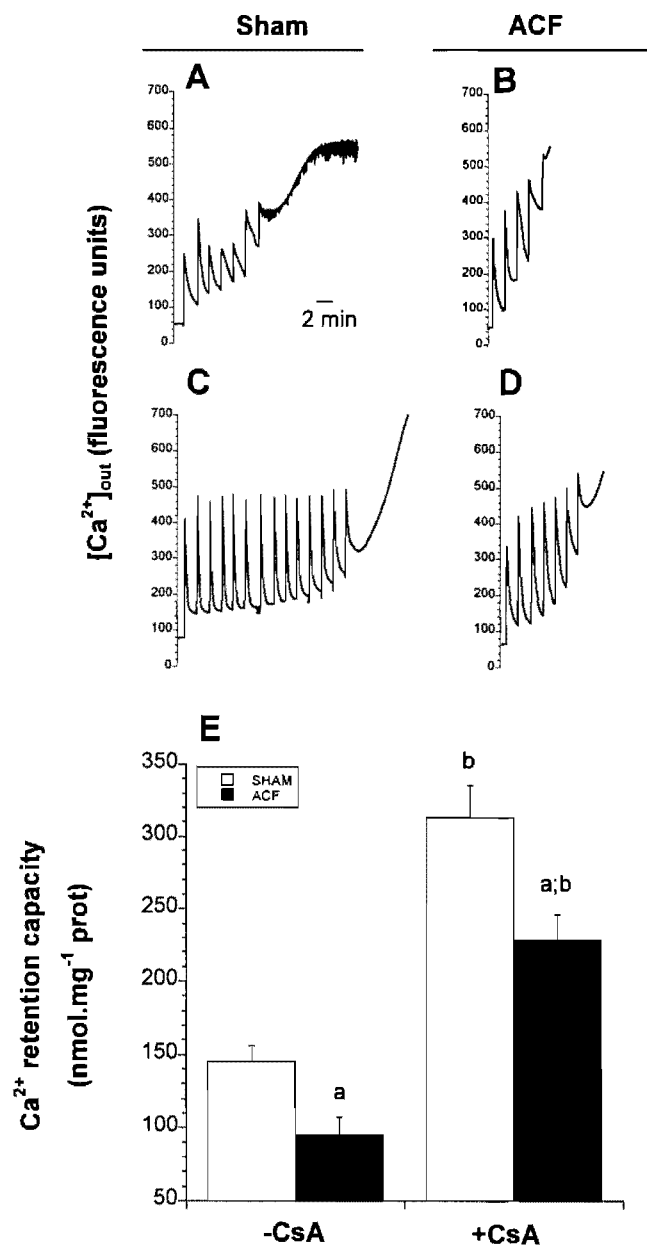


Figure 3

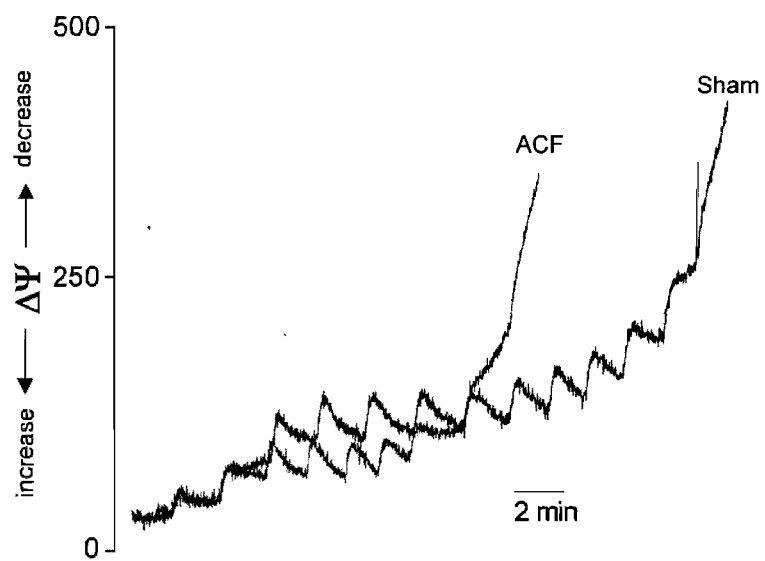


Figure 4

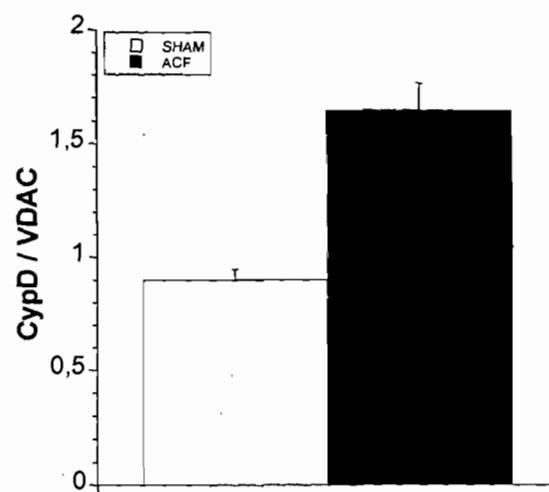


Figure 5

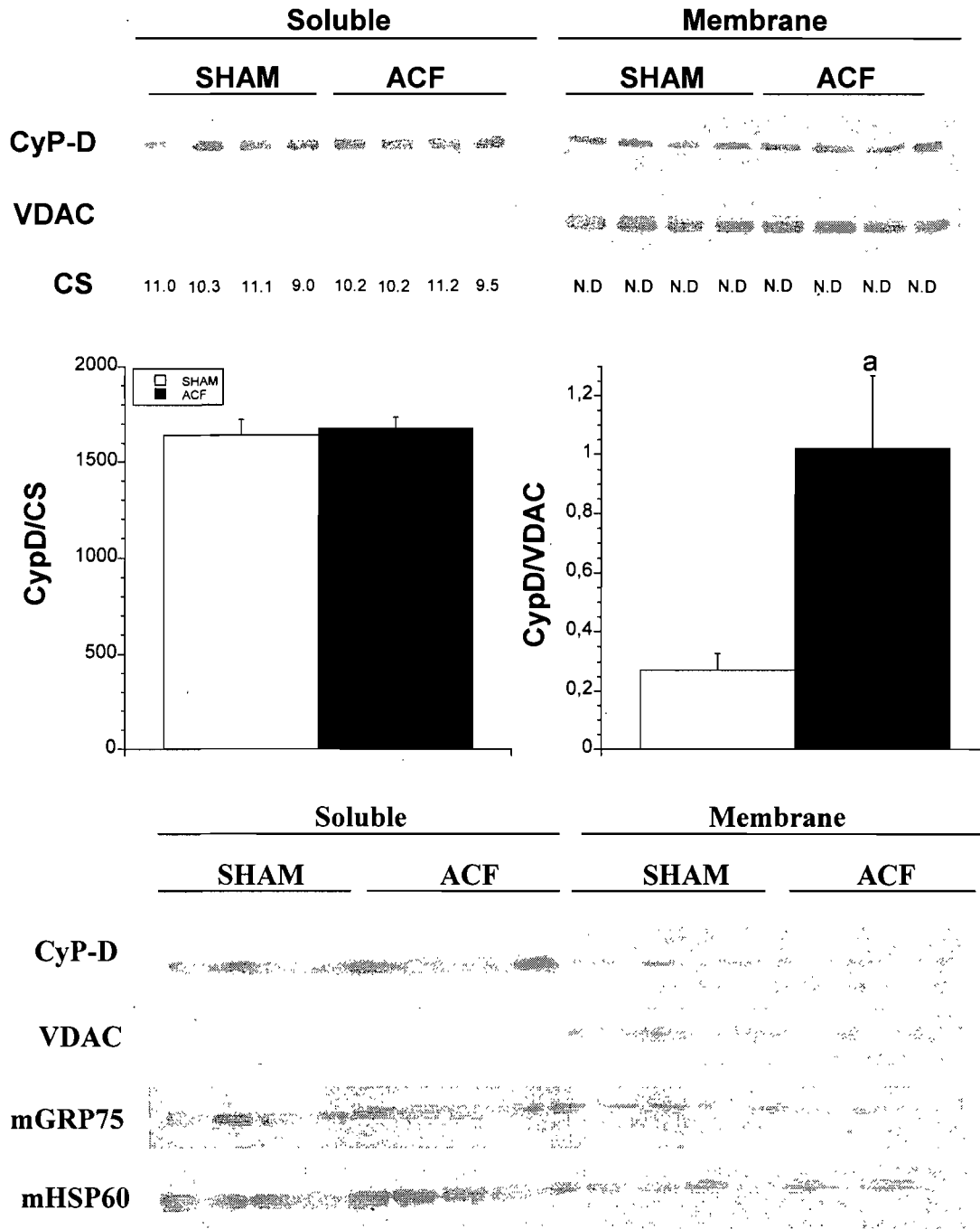


Figure 6

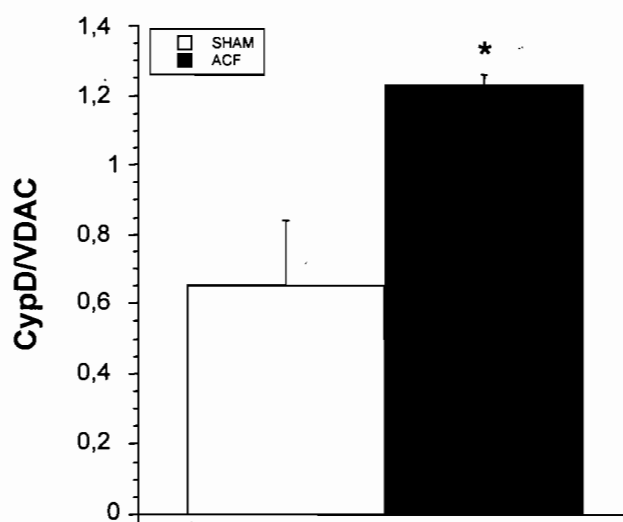
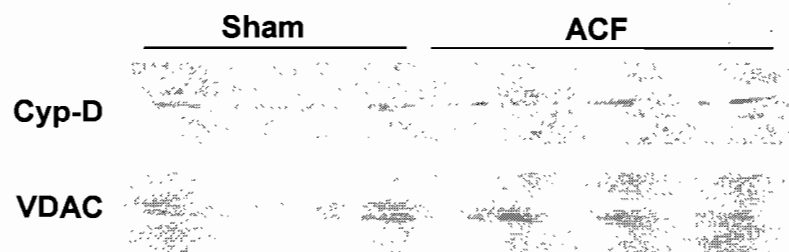


Figure 7

