

**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

Vulnérabilité cardiaque au stress au cours du remodelage ventriculaire pathologique  
induit par surcharge volumique : Rôle du pore de perméabilité transitionnelle (PTP)

par

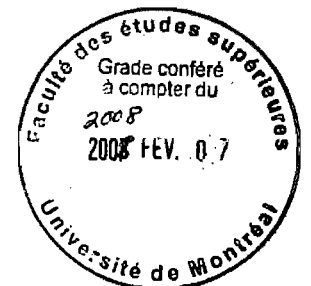
Alexis Ascah

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade  
de Maître ès Sciences (M.Sc.) en sciences biomédicales

Décembre 2007

© Alexis Ascah, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Vulnérabilité cardiaque au stress au cours du remodelage ventriculaire pathologique induit par surcharge volumique : Rôle du pore de perméabilité transitionnelle (PTP)**

présenté par

Alexis Ascah

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

.....  
Président-rapporteur

Yan Burelle  
Directeur de recherche

.....  
Membre du jury

Mémoire accepté le .....

## SUMMARY

Heart failure is associated with an increase in cellular death, phosphorylant oxidation dysfunctions, as well as the release of mitochondria pro-apoptotic factors. Our research is oriented towards determining the mechanisms that bring upon these phenomenons. This can be done by studying the mitochondrial functions at an early stage in pathological ventricular remodeling induced by chronic volume overload (VOL). It has been shown, by research in our laboratory, that at the compensated stage of hypertrophy in WKHA inbred rats, the mitochondria develops vulnerability at the opening of the ptp in stress related conditions. Once these results were obtained, we decided to demonstrate that the mitochondrials dysfonctions affect the heart in an ischemia-reperfusion (I-R) protocol *ex vivo*. The PTP opening was measured *in situ* by loading [<sup>3</sup>H]deoxyglucose (DOG) in the mitochondria. We have observed that the DOG loading in mitochondria (DOG index) was superior in the VOL group vs the Sham group (107±6 vs 69±7). We have also measured the phosphorylant oxidation dysfonctions in the mitochondria post I-R. The maximal respiration with ATP presence as well as RCR (5,1±0,5 vs 3,8±0,3) has been found to be superior in the Sham hearts due to lesser fonctional recuperation and to higher damaged tissue in reperfusion. The research brought us to put forward the hypothesis that mitochondrial vulnerabilty development to PTP opening can be an early mechanism resulting in heart failure as well as cellular death due to hypertrophic cardiac remodeling.

Key words: cardiac hypertrophy, permeability transition pore (PTP), ischemia-reperfusion (I-R), cardioprotection, [<sup>3</sup>H]deoxyglucose.

## RÉSUMÉ

L'insuffisance ventriculaire gauche 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. Un des axes de recherche du laboratoire est de déterminer les mécanismes en étudiant la fonction mitochondriale à un stade précoce du remodelage ventriculaire pathologique induit par surcharge volumique chronique (VOL). Il a été démontré par notre laboratoire qu'à l'état compensé d'hypertrophie chez le rat consanguin WKHA les mitochondries développent une vulnérabilité à l'ouverture du PTP en situation de stress. À la suite de l'obtention de ces résultats nous avons décidé de déterminer si ces dysfonctions mitochondriales pourraient affecter un cœur perfusé au cours d'un protocole d'ischémie-réperfusion (I-R) *ex-vivo*. L'ouverture du PTP a été mesurée *in situ* par la technique de séquestration du [<sup>3</sup>H]déoxyglucose (DOG) par les mitochondries. Nous avons observé que l'incorporation de DOG dans les mitochondries (l'index DOG) était supérieure dans le groupe VOL vs Sham (107±6 vs 69±7). Nous avons aussi mesuré la dysfonction de l'oxydation phosphorylante des mitochondries suivant l'I-R. La respiration maximale en présence d'ADP ainsi que le RCR (5,1±0,5 vs 3,8±0,3) se sont avérées supérieures chez les cœurs Sham. Ceci était associé à une moins bonne récupération fonctionnelle et un dommage tissulaire accru en réperfusion. Ces études nous ont emmené à émettre l'hypothèse que le développement de la vulnérabilité des mitochondries à l'ouverture du PTP pourrait constituer un des mécanismes précoces menant ultimement à l'insuffisance ventriculaire et à la mort cellulaire suite au remodelage cardiaque hypertrophique.

Mots clés: hypertrophie cardiaque, pore de perméabilité transitionnelle (PTP), ischémie-réperfusion (I-R), cardioprotection, [<sup>3</sup>H]déoxyglucose.

## TABLE DES MATIÈRES

SUMMARY .....	III
RÉSUMÉ .....	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
FIGURES .....	VIII
TABLEAUX .....	XI
ABRÉVIATIONS.....	XII
REMERCIEMENTS.....	XIV
<b>Chapitre 1- Revue de littérature.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Présentation du travail expérimental.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Présentation de la revue de littérature.....</b>	<b>5</b>
<b>2 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LA VIE ET LA MORT</b>	
<b>CELLULAIRE .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Production d'ATP et mécanisme de l'oxydation phosphorylante .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Mort cellulaire : apoptose versus nécrose.....</b>	<b>9</b>
2.2.1 La voie extrinsèque.....	12
2.2.2 La voie intrinsèque.....	13
<b>2.3 Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales.....</b>	<b>15</b>
2.3.1 La famille des Bcl-2.....	15
2.3.2 Le PTP.....	16
2.3.2.1 Régulation du PTP .....	17
2.3.2.2 Structure du PTP.....	19
<b>3 ROLE DU PTP DANS LE DOMMAGE ISCHÉMIQUE AU NIVEAU DU</b>	
<b>COEUR.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Quantification de l'ouverture du PTP sur le cœur entier .....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Relâche de NAD <sup>+</sup> .....	28
3.1.2 Séquestration mitochondriale du [ <sup>3</sup> H]-DOG .....	30
3.1.2.1 Protocole de perfusion.....	32
3.1.2.2 Calcul de l'index d'ouverture du PTP.....	34
<b>3.2 Utilisation de la technique du [<sup>3</sup>H]-DOG pour l'étude de la cardio-</b>	
<b>protection.....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Cyclosporine A et Sanghlifehrin A.....	35
3.2.2 Pyruvate et Propofol .....	36

3.2.3	Préconditionnement ischémique et exercice physique .....	40
<b>4</b>	<b>RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LE REMODELLAGE HYPERTROPHIQUE DU CŒUR ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE.....</b>	<b>43</b>
4.1	Introduction .....	43
4.2	Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans le cœur insuffisant.....	45
4.3	Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries en phase d'hypertrophie compensée.....	50
4.4	Activation des mécanismes mitochondriaux de mort cellulaire dans le cœur insuffisant.....	54
4.5	La vulnérabilité au stress : un contributeur potentiel à la transition vers l'insuffisance cardiaque. ....	57
<b>5</b>	<b>MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>64</b>
5.1	Animaux.....	64
5.2	Surcharge volumique par fistule aorto-cavale.....	64
5.3	Paramètres morphologiques .....	65
5.4	Perfusion de cœur en mode Langendorff.....	66
5.5	Protocole original de perfusion avec le [ <sup>3</sup> H]-DOG .....	66
5.6	Isolation des mitochondries et mesure de radioactivité .....	68
5.7	Calcul de l'index de séquestration mitochondriale du [ <sup>3</sup> H]-DOG .....	69
5.8	Mesure de la respiration mitochondriale.....	69
5.9	Dosages enzymatiques .....	70
<b>6</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>72</b>
6.1	Optimisation du protocole de chargement avec le [ <sup>3</sup> H]-DOG.....	72
6.2	Remodelage ventriculaire pathologique et ses conséquences chez le Rat WKHA.....	75
6.2.1	Paramètres morphologiques .....	75
6.2.2	Activité des enzymes mitochondriales.....	77
6.2.3	Réponse cardiaque à l'ischémie-réperfusion.....	78
<b>7</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>83</b>
7.1	Optimisation du protocole de chargement du [ <sup>3</sup> H]-DOG.....	83

<b>7.2</b>	<b>Modification de la capacité oxydative durant la phase compensée d'hypertrophie.....</b>	<b>85</b>
<b>7.3</b>	<b>Modification de la vulnérabilité au stress.....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>91</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>92</b>
	<b>ANNEXE .....</b>	<b>103</b>



## FIGURES

Figure 1: La chaîne respiratoire et ses inhibiteurs.

Figure 2: Comparaison des étapes clés de l'apoptose et de la nécrose.

Figure 3: La cascade des caspases.

Figure 4: Les voies extrinsèques de la mort cellulaire.

Figure 5: Représentation schématique des voies de mort cellulaire intrinsèque et extrinsèque qui régulent l'apoptose chez le mammifère.

Figure 6: Facteurs contribuant à l'ouverture du PTP suite à l'ischémie-réperfusion.

Figure 7: Effet de la CsA sur la fonction contractile du cœur soumis à une ischémie-réperfusion.

Figure 8: Effet de la CsA sur le contenu cardiaque en nucléotides adénylés suivant une période d'ischémie-réperfusion.

Figure 9: Effet de la CsA sur la taille de la zone nécrotique induite par l'ischémie-réperfusion.

Figure 10: Effet de la CsA sur le contenu mitochondrial en cytochrome c après une période d'ischémie.

Figure 11: Effet de la CsA et de la Sangliféhrin-A, un analogue non immunosuppresseur sur la fonction contractile et le dommage tissulaire suite à une période d'ischémie-réperfusion.

Figure 12: Effet de la CsA et de la Methyl-Valine-4-Cyclosporine, un analogue non immunosuppresseur sur le dommage tissulaire et l'ouverture du PTP suite à une ischémie-réperfusion cardiaque.

Figure 13: Effet d'une ischémie sur le contenu en  $\text{NAD}^+$  dans le coeur de rat.

Figure 14: Effet de la CsA et de la Methyl-Valine-4-Cyclosporine, un analogue non immunosuppresseur sur le contenu tissulaire et mitochondrial en  $\text{NAD}^+$ .

Figure 15: Métabolisme du désoxyglucose.

Figure 16: Principe de la méthode de séquestration mitochondriale du  $[^3\text{H}]\text{-DOG}$ .

Figure 17: Effets de la présence de pyruvate sur la fonction contractile et l'ouverture du PTP lors d'une I-R.

Figure 18: Relation temporelle entre l'ouverture du PTP et le pH de l'effluent coronarien au cours de la réperfusion.

Figure 19: Effets du traitement au propofol sur la fonction contractile et l'ouverture du PTP lors d'une ischémie-réperfusion.

Figure 20: Voies de signalisation activées par le préconditionnement (PC).

Figure 21: Effets d'une ischémie-réperfusion et de l'entraînement physique à court terme sur le rendement de l'isolation des mitochondries et sur la séquestration du [<sup>3</sup>H]DOG.

Figure 22: Morphologie des cardiomyocytes et des mitochondries dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par le TNF $\alpha$ .

Figure 23: Production de radicaux libres par des particules mitochondriales isolées à partir de cœurs normaux et insuffisants.

Figure 24: Fonction respiratoire mesurée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs en phase d'hypertrophie compensée et d'insuffisance.

Figure 25: 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.

Figure 26 Effet de l'hypertrophie cardiaque sur la respiration mitochondriale lors d'une inhibition du complexe IV avec NO $\bullet$ .

Figure 27: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur l'expression de la NO-synthase.

Figure 28: Effet du remodelage ventriculaire hypertrophique sur la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress *in vitro*.

Figure 29: Effet de la surcharge volumique sur la fonction basale de mitochondries cardiaques.

Figure 30: Effet de la surcharge volumique sur la dysfonction respiratoire induite par une anoxie-réoxygénation *in vitro*.

Figure 31: Effet de la surcharge volumique sur la vulnérabilité à l'ouverture du PTP induite par surcharge calcique.

Figure 32: Réponse du myocarde à 30minutes de chargement en circuit fermé (n=8) ou ouvert (n=4) de [<sup>3</sup>H]-DOG chez le Rat SD.

Figure 33 : Réponse du myocarde à 30minutes de chargement en circuit ouvert de DOG froid chez les rats SD avec un tampon contenant 0,5mM lactate et 0,1mM pyruvate (n=4) ou sans (n=2).

Figure 34 : Réponse du myocarde à 30 (n=2) ou 20minutes (n=2) de chargement en circuit ouvert du DOG chez le Rat SD.

Figure 35: Réponse du myocarde à une ischémie-réperfusion *ex vivo* chez des animaux Sham et ACF.

Figure 36 : Relâche de LDH, séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG et mesure de la fonction respiratoire sur mitochondries isolées postréperfusion dans les groupes Sham et ACF.

Figure 37: Évolution du débit coronaire et de la pression ventriculaire développée (LVDP) observée dans l'étude de Ciminelli et al (2006).

Figure 38: Récupération de la fonction cardiaque de cœurs normaux et hypertrophiés à la suite d'une période d'ischémie.

Figure 39 : Relâche de cytochrome c et de Smac/Diablo dans le cytosol lors d'une ischémie réperfusion sur des cœurs d'animaux Sham (n=4) et ACF (n=4).

Figure 40: Ouverture du PTP représentée en unité DOG dans les mitochondries cardiaques isolées de rats de 12 sem (A) et 18 sem (B) après une ligature d'un artère coronaire (CAL) ou non (Sham).

Figure 41 : Expression de la cyclophiline-D (Cyp-D) dans la fraction mitochondriale totale et dans la fraction mitochondriale membranaire chez des rats ACF et Sham de 12 semaines.

**TABLEAUX**

Tableau I: Régulation de l'ouverture du PTP par différents effecteurs physiologiques.

Tableau II: Activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients humains atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques.

Tableau III: Respiration de mitochondries isolées de coeurs contrôles (SHAM) ou 18 sem post-ligature de l'artère coronaire (CAL).

Tableau IV : Données morphométriques et rendement de l'isolation des mitochondries chez les rats Sham et ACF.

Tableau V: Activité des enzymes mitochondriales chez les rats Sham et ACF.

Tableau VI : Effets du chargement du DOG en circuit fermé sur les fonctions cardiaques dans le cœur perfusé de rat.

## ABRÉVIATIONS

ADN = acide désoxyribonucléique  
 ADP = adénine di-phosphate  
 AIF = facteur d'induction de l'apoptose  
 AMP = adénine mono-phosphate  
 ANT = translocateur des nucléotides adénylés  
 APAF = apoptosis protein associated factor  
 ATP = adénine tri-phosphate  
 Bad = Bcl-<sub>XL</sub>/Bcl-2 associated death promoter homolog  
 Bak = Bcl-2 antagonist killer  
 Bax = Bcl-2 associated X protein  
 Bcl-2 = B-cell lymphoma 2  
 Bcl<sub>XL</sub> = 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 e1b 19kd interacting protein 3  
 BSA = albumine de sérum bovin  
 Ca<sup>2+</sup> = ion calcique  
 Caspase = cysteinyl-aspartate-cleaving proteases  
 CS = citrate synthase  
 CsA = cyclosporine A  
 Cyp-D = cyclophiline-D  
 Da = dalton  
 DMPO = 5,5'-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide  
 DOG = déoxyglucose  
 EDP = pression diastolique finale  
 EGTA = éthylène glycol bis(2-aminoéthyl éther)-N,N,N',N'-acide tétraacétique  
 EMD = 2-méthyl-4,5-di-(méthylsulfonyl)-benzoyl)-guanidine  
 EndoG = endonucléase G  
 ERK = kinase régulée extracellulaire  
 FAC = fistule aorto-cavale  
 FADH<sub>2</sub> = flavine-adénine dinucléotide (réduit)  
 GC = guanylyle cyclase  
 GSK = glycogène synthase kinase  
 IPC ou PC = préconditionnement ischémique  
 I-R = ischémie-réperfusion  
 LDH = lactate déshydrogénase  
 LVDP = pression développée par le ventricule gauche  
 MAC = canal inducteur de l'apoptose via la mitochondrie  
 MnSOD = super oxyde dismutase manganèse dépendante  
 MV-4-Cs = N-méthyl-valine-CsA  
 NADH = nicotinamide-adénine dinucléotide (réduit)  
 NADPH = nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate (réduit)  
 NHE = échangeur sodium-hydrogène  
 NIX = NFκB induceur kinase  
 NOS = oxyde nitrique synthase  
 OMI ou HtrA2 = high temperature requirement protein A2  
 PCr = phospho-créatine  
 P<sub>i</sub> = phosphate inorganique

PKB ou Akt = protéine kinase B  
PKC = protéine kinase C  
PKG = protéine kinase G  
PTP = pore de perméabilité transitionnelle  
PUMA = p53-upregulated modulator of apoptosis  
RCR = ratio de contrôle respiratoire  
ROS = spécimens réactifs dérivés de l'oxygène  
SD = Sprague-Dawley  
SfA = sangliféhrine A  
Smac/DIABLO = second mitochondria-derived activator of caspases-direct inhibitor of  
apoptosis binding protein with low P<sub>i</sub>  
TNF $\alpha$  = facteur de nécrose tumoral  $\alpha$   
TUNEL = Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling  
VDAC = canal anionique voltage dépendant  
VOL = surcharge volumique  
WKHA = Wistar-Kyoto hyperactif  
XIAP = X-linked inhibitor of apoptosis protein

## REMERCIEMENTS

Je ne pourrais me permettre de commencer sans remercier mon directeur de recherche Dr. Yan Burelle qui m'a guidé tout au long de ma maîtrise. Son soutien, ses conseils, son implication dans le laboratoire, sa connaissance, sa patience et sa motivation ne me laissent pas d'autre choix que de continuer avec lui au doctorat.

J'aimerais également remercier Jimmy Matas qui m'a aidé à recueillir les résultats de ce mémoire et est également un modèle de persévérance par son travail acharné et méticuleux. Sans ma poule, les journées de laboratoire auraient été beaucoup plus longues.

Merci à tous mes confrères de laboratoire qui m'ont aidé et encouragé à travers ce projet de maîtrise, tout particulièrement, Mariannick Marcil (dit Marichoux) qui m'a aidé dans mon projet et a toujours été une personne de référence.

Merci à mes parents qui ont fait de moi l'homme que je suis par leur éducation hors pair et leur patience. Jamais je ne pourrai assez-vous remercier.

À mon amour Valérie que j'aime non seulement pour ce qu'elle est, mais pour ce que je suis quand nous sommes ensemble. Merci mon amour.

J'aimerais terminer en donnant un gros bisou à mes deux sœurs d'amour Jeanne-Laurence (et j'espère un jour aller manger dans ton auberge) et Isabelle à qui je souhaite bonne chance pour ses études graduées

**En espérant être un chercheur qui trouve**

# **Chapitre 1- Revue de littérature**



## INTRODUCTION

### 1.1 Présentation du travail expérimental

Les mitochondries sont des organelles vitales de la cellule qui accomplissent une variété de fonctions fondamentales dont la plus connue est la synthèse de l'ATP par l'oxydation phosphorylante via la chaîne respiratoire. Elles sont aussi impliquées dans plusieurs autres voies métaboliques comme la synthèse des acides aminés, des vitamines, et des acides gras [21, 119] et participent également à l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . Elles ont aussi des rôles délétères comme la production d'espèces réactives dérivées de l' $\text{O}_2$  (ROS) jusqu'à la mort cellulaire programmée (apoptose) qui est déclenchée par la relâche de plusieurs facteurs pro-apoptotiques normalement confinés dans la matrice mitochondriale.

La thématique générale du laboratoire de Yan Burelle porte sur la plasticité mitochondriale dans le muscle strié squelettique et cardiaque en situation physiologique et pathologique. Au cours des dernières années, le laboratoire s'est particulièrement intéressé aux mécanismes de perméabilité mitochondriale. Bien que plusieurs mécanismes de perméabilité semblent exister, l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle mitochondriale (PTP), un canal non spécifique à haute conductance formé par un complexe protéique de la membrane interne (dont l'identité demeure à être confirmée) est étudiée de manière plus particulière. Le PTP constitue un mécanisme important dans le déclenchement de l'apoptose et de la nécrose dans plusieurs organes et types cellulaires [80].

Le travail effectué au cours de ce programme de Maîtrise a porté plus particulièrement sur le remodelage ventriculaire hypertrophique conduisant à l'insuffisance cardiaque. Plusieurs études chez l'Homme et l'animal ont démontré

que l'insuffisance ventriculaire est associée à une atteinte structurale des mitochondries et à des dysfonctions incluant une diminution de la capacité oxydative, une augmentation de la production de ROS par la chaîne respiratoire et de l'occurrence de mutations de l'ADN mitochondrial. De plus, plusieurs études ont démontré l'existence de mort cellulaire et un relâchement accru de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux. Cependant, la grande majorité des études disponibles ont été effectuées sur les cœurs ayant atteint des stades avancés d'insuffisance, ce qui engendre deux conséquences sur notre compréhension de l'insuffisance cardiaque. D'une part, il demeure incertain si les dysfonctions mitochondriales sont des causes du développement de l'insuffisance cardiaque ou des conséquences tardives. D'autre part, il existe peu d'informations au sujet des mécanismes précoces survenant au cours de la phase compensée de l'hypertrophie cardiaque pathologique qui pourraient mener à l'activation de la voie mitochondriale de la mort cellulaire et éventuellement à la décompensation et l'insuffisance cardiaque.

Notre laboratoire a donc initié des études visant à déterminer quelles sont les modifications qui surviennent au niveau mitochondrial au cours de la phase compensée d'hypertrophie pathologique. Nous avons utilisé un modèle bien défini de surcharge volumique chronique (VOL) induite par fistule aorto-cavale (ACF). En utilisant ce modèle chez le rat consanguin WKHA (une souche de rats consanguins affichant une susceptibilité au remodelage pathologique induit par surcharge), nous avons récemment démontré qu'à l'état compensé d'hypertrophie (12 semaines de VOL), les mitochondries affichaient des fonctions basales (potentiel de membrane et fonction respiratoire) identiques au groupe témoin (Sham). Cependant, en comparaison aux Sham, les mitochondries des cœurs VOL affichaient une nette susceptibilité à l'anoxie-réoxygénation *in vitro*, qui était abolie par la cyclosporine A

(CsA), un inhibiteur du PTP. De plus, l'induction directe du PTP par surcharge calcique *in vitro* a confirmé que la vulnérabilité mitochondriale des sujets VOL à l'ouverture du PTP était augmentée comparativement aux Sham.

Ces résultats ont mené à l'hypothèse qu'au cours du remodelage ventriculaire hypertrophique, les mitochondries développent une vulnérabilité à l'ouverture du PTP en situation de stress. Ce qui pourrait ultimement contribuer à l'activation de la mort cellulaire et à la transition du cœur vers l'état d'insuffisance. Le concept de vulnérabilité au stress a très peu été exploité et est pertinent dans ce contexte dans la mesure où les cardiomyocytes (et leurs mitochondries) peuvent être exposés de manière aiguë et/ou chronique à des stress au cours du remodelage cardiaque (demande énergétique élevée, ischémie et hypoxie, stress oxydant, cytokines, modification de l'homéostasie calcique).

L'objectif du travail effectué au cours de ce mémoire était de déterminer 1) si la vulnérabilité mitochondriale et l'ouverture du PTP suite à un stress identifié *in vitro* sur mitochondries isolées chez les rats WKHA était également observable dans le cœur isolé perfusé soumis à une ischémie-réperfusion (un stress qui induit l'ouverture du PTP) et 2) si ceci était associé à une augmentation des dysfonctions contractiles et du dommage tissulaire en réperfusion.

Les résultats obtenus supportent l'hypothèse que le développement de la vulnérabilité des mitochondries à l'ouverture du PTP est un phénomène précoce qui survient au cours de la phase compensée d'hypertrophie à un moment où aucune défaillance systolique n'est observable et en l'absence de dysfonction mitochondriale basale. De plus, ceci est associé à une vulnérabilité accrue du cœur aux dommages

ischémiques. Ces études pavent la voie à l'identification des mécanismes responsables de cette vulnérabilité à l'échelle mitochondriale.

## **1.2 Présentation de la revue de littérature**

La revue de littérature présentée dans ce mémoire est articulée en deux parties. Dans la première, une revue générale sur la mitochondrie et son rôle dans la signalisation de la mort cellulaire est présentée. Compte tenu de la nature du travail expérimental effectué, une attention particulière est portée au phénomène de perméabilité transitionnelle mitochondriale ainsi qu'à ses conséquences. Une revue de littérature concernant le rôle du PTP dans le dommage ischémique au niveau du cœur, les bienfaits de son inhibition ainsi que des méthodes utilisées pour quantifier son ouverture dans le cœur entier est également inclus dans cette section.

La deuxième partie de la revue de littérature est consacrée à l'hypertrophie cardiaque pathologique et plus particulièrement aux modifications de la fonction mitochondriale qui ont été observées à différents stades de la progression de la pathologie notamment au niveau de la morphologie, de la fonction respiratoire, de la production de ROS, de la signalisation de l'apoptose et la vulnérabilité de ces dernières au stress.

## **2 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LA VIE ET LA MORT CELLULAIRE**

### **2.1 Production d'ATP et mécanisme de l'oxydation phosphorylante**

La mitochondrie est une organelle à double membrane dont le rôle le plus connu est la production d'ATP. Les cardiomyocytes possèdent la plus grande densité mitochondriale de toutes les cellules des mammifères. Elles représentent entre 30 et 40% du volume des cardiomyocytes et sont responsables de plus de 90% de la

production d'ATP de ces derniers [103, 148]. La chaîne respiratoire est composée de cinq complexes enzymatiques situés dans la membrane interne et chacun de ces complexes est constitué de plusieurs sous-unités protéiques (le nombre varie selon le complexe).

- **complexe I** : NADH-ubiquinone oxydoréductase (25 sous-unités),
- **complexe II** : succinate-ubiquinone oxydoréductase (4 sous-unités),
- **complexe III** : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (9-10 sous-unités)
- **complexe IV** : cytochrome c oxydase (13 sous-unités). Il contient le site de liaison de l'oxygène.

Cet ensemble de complexes est aussi désigné sous le nom de chaîne de transfert d'électrons.

Les électrons sont transférés séquentiellement à chacun des complexes qui passent par un état réduit lorsqu'ils acceptent un électron puis un état oxydé lorsque les électrons sont transférés au complexe suivant. Cette chaîne de transport contient également le coenzyme Q (CoQ), une quinone lipophile qui diffuse dans la membrane interne et assure le transfert des électrons des complexes I et II vers le complexe III. Le second transporteur mobile de la chaîne respiratoire est le cytochrome c, qui est fixé aux cardiolipines à la surface de la membrane interne, et qui établit une navette d'électrons entre les complexes III et IV. L'apport en électrons à la chaîne respiratoire est assuré par l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> au niveau des complexes I et II respectivement alors que l'oxygène agit comme accepteur final d'électrons au niveau du complexe IV où l'oxygène moléculaire et l'hydrogène se combinent pour former de l'eau. L'énergie libérée par cette succession

de réaction redox est couplée à la sortie de protons ( $H^+$ ) de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV.

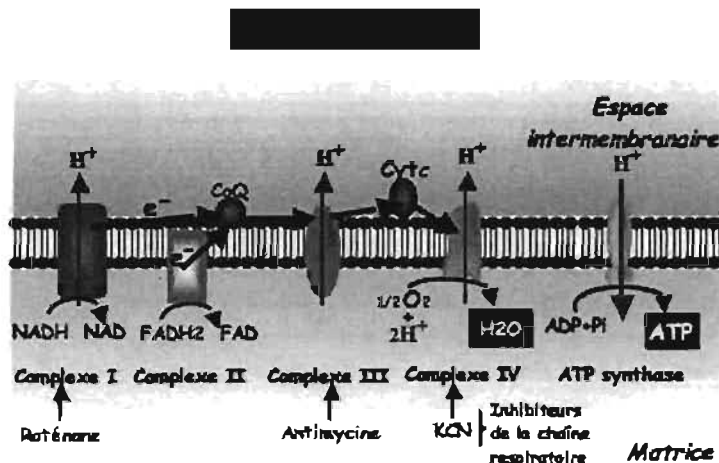


Figure 1: La chaîne respiratoire et ses inhibiteurs.

Cette sortie de protons a comme conséquence la génération d'un potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) et d'un gradient de pH ( $\Delta pH$ ). Ce sont les deux composantes de la force proton motrice ( $\Delta p$ ). Les protons se retrouvant dans l'espace intermembranaire peuvent passer par l'ATP synthase (complexe V) qui couple la réentrée de protons dans la matrice à la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP nouvellement synthétisé est transporté hors de la mitochondrie en échange d'ADP provenant du métabolisme cellulaire. Cet échange implique la translocase des nucléotides adénylés (ANT) et les canaux anioniques dépendants du voltage (VDAC) localisés dans la membrane interne et externe respectivement. ANT et VDAC sont préférentiellement localisés aux points de contacts entre ces deux membranes où ils établissent vraisemblablement un lien fonctionnel [167]. VDAC encore nommée porine, car elle ressemble aux porines de la membrane externe des bactéries, forme un canal qui laisse passer les molécules de petite taille (< à 10kDa) telles que des anions, des cations, différents métabolites (acides gras, pyruvate...) et des nucléotides. C'est donc un canal non spécifique. Il en résulte que la composition de l'espace intermembranaire est comparable à celui du cytosol [70, 140].

### **La production d'espèces réactives de l'oxygène**

La chaîne respiratoire a aussi ses inconvénients. La mitochondrie est reconnue comme une source majeure de production de ROS et les études sur mitochondries isolées montrent que ce serait via les complexes I et III de la chaîne respiratoire [33]. Il est connu qu'environ 2% des électrons sont expulsés de cette chaîne et réagissent avec l'O<sub>2</sub> pour former des espèces réactives dérivées de l'oxygène, mieux connu sous le nom de ROS [31]. Le terme ROS désigne toute espèce oxygénée activée, radicalaire ou non, réagissant sans apport énergétique ni catalyse avec les substrats organiques. Ces substrats peuvent être des protéines, des lipides, des sucres ou des acides nucléiques. La présence de ROS cause la dénaturation (introduction d'un groupement carbonyle C=O) et/ou la fragmentation des protéines et des acides nucléiques, la peroxydation des lipides (ce qui entraîne l'altération du fonctionnement des membranes et des dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux), et en présence de traces métalliques, l'oxydation du glucose avec libération de d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'OH<sup>•</sup>, ce qui engendre des coupures et des mutations de l'ADN. Cependant, des études récentes sur la transduction du signal ont montré que les ROS à faible concentration servent aussi de messenger intracellulaire pour induire notamment les mécanismes de défense ou de réparation contre le dommage cellulaire.

L'organisme possède un certain nombre de moyens de défense contre les atteintes des radicaux libres mettant en jeu des enzymes, par l'expression de gènes particuliers, comme les superoxydes dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase. Les défenses antioxydantes sont capables de faire face et de détruire les radicaux libres produits en excès dans l'organisme. On dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si ce n'est pas le cas par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, l'excès des

radicaux est appelé stress oxydant. Des conditions de stress oxydant trop élevé peuvent engendrer le suicide cellulaire ou apoptose.

## **2.2 Mort cellulaire : apoptose versus nécrose**

Le terme apoptose est dérivé d'un ancien mot grec (αποπτωσις) qui signifiait « la chute des pétales d'une fleur ou des feuilles d'un arbre en automne ». Ce processus de mort programmé permet l'élimination des cellules non désirées, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie. Les cellules mourantes rétrécissent et se détachent des cellules environnantes. Le cytoplasme et le noyau se condensent. Il y a rupture du nucléole et de la membrane nucléaire et un désassemblage des structures fondamentales. De plus, il y a condensation de la chromatine et la membrane plasmique forme des protrusions qui peuvent être expulsées pour former des corps apoptotiques. En plus des dommages morphologiques observés, il y a également des modifications biochimiques qui prennent place. Une des plus notables, est probablement le clivage de la chromatine condensée en fragments internucléosomals de 180-200 paires de bases [156, 172, 173]. Une autre manifestation précoce de l'apoptose implique l'externalisation des molécules de phosphatidylsérine, qui résident normalement du côté cytosolique de la membrane plasmique. Suivant un stimulus apoptotique, ces molécules pivotent du côté extracellulaire de la membrane plasmique [29, 124, 125], servant de stimulus déclencheur pour la phagocytose de la cellule apoptotique ou des corps apoptotiques par les macrophages et les cellules phagocytaires non professionnelles [65, 66].

Une caractéristique essentielle de l'apoptose est qu'elle se déroule sans provoquer d'inflammation. L'apoptose se distingue en ce sens de la nécrose, l'autre façon dont peut mourir une cellule qui est beaucoup plus dommageable pour l'organisme. En effet, la nécrose est une mort cellulaire accidentelle qui survient lors



d'un dommage tissulaire (anoxie aigue, un manque soudain de nutriments, ou lors de dommages extrêmes physiques ou chimiques). Contrairement au rétrécissement des cellules apoptotiques, les cellules nécrotiques et leurs organelles perdent leur habilité à maintenir l'homéostasie osmotique et commencent à gonfler suite à une importante entrée d'eau [141]. Les cellules abîmées deviennent alors oedémateuses, puis leurs membranes cellulaires éclatent déversant le contenu cellulaire dans l'espace interstitiel environnant ce qui provoque une inflammation.

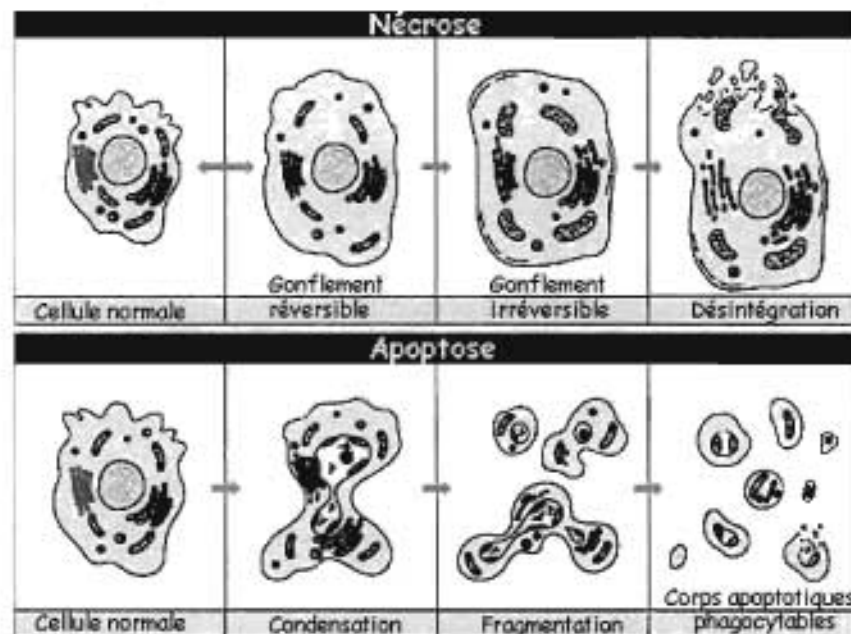


Figure 2: Comparaison des étapes clés de l'apoptose et de la nécrose.

L'apoptose est le point final d'une cascade d'événements demandant de l'énergie qui est initié par un stimuli de mort cellulaire. Le phénomène de l'apoptose semble se dérouler en quatre phases qui se chevauchent partiellement [169] (Figure 2) :

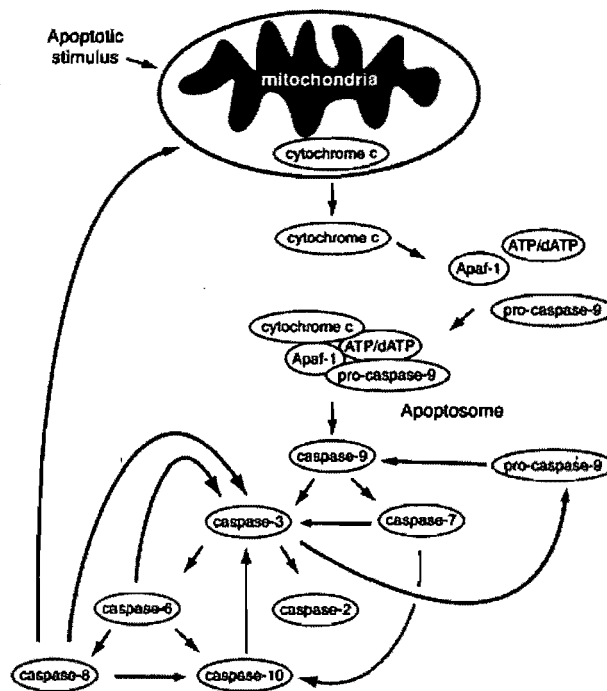
1. La phase précoce ou initiale au cours de laquelle un stimulus provoque ou initie la réponse apoptotique. Ce stimulus peut être un facteur externe qui active des récepteurs à la surface de la cellule ou peut provenir de l'intérieur de la cellule lorsque certaines organelles ou l'ADN nucléaire sont endommagés.

2. La phase de transduction en signal au cours de laquelle le stimulus inducteur enclenche une cascade de signalisation visant l'activation de la machinerie effectrice de la mort cellulaire.
3. La phase effectrice au cours de laquelle les caspases, des protéases effectrices activées, ainsi que d'autres protéines de signalisation, procèdent au démantèlement de la cellule.
4. La phase post mortem au cours de laquelle la chromatine et l'ADN de la cellule sont dégradés.

Il existe deux grandes voies par lesquelles l'apoptose peut être induite dans une cellule: la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. Bien que les événements initiaux menant à l'apoptose diffèrent dans chacun des cas, les deux voies ont en commun de mener à l'activation des caspases (Figure 3), ce qui constitue un point de non-retour pour la cellule.

Les caspases (de l'anglais *cysteiny-l-aspartate-cleaving proteases*) sont un groupe de protéases à cystéine présentes dans le cytoplasme et certaines organelles sous forme de procaspases inactives. Les procaspases sont clivées et dimérisées pour former les caspases actives. Chez les mammifères, il existe quatorze caspases différentes [155], appartenant à la famille des caspases inflammatoires (1, 4 et 5), des caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et des caspases effectrices (3, 6 et 7) [38, 39, 77, 123, 142]. Les caspases 12, 13 et 14 ne sont pas encore bien catégorisées, mais feraient vraisemblablement partie de la famille des caspases inflammatoires. Les caspases initiatrices sont les premières à être activées par des signaux extrinsèques ou intrinsèques à la cellule. Il est bien documenté que les signaux extrinsèques mènent au clivage et à l'activation des caspases initiatrices 8 et 10 alors que les signaux intrinsèques mènent à l'activation de la caspase initiatrice 9 (Figure 3). Cette

cascade cause éventuellement l'activation des caspases effectrices qui clivent une variété de substrats incluant des inhibiteurs de nucléases, le cytosquelette et d'autres protéines clé de la cellule, amenant ainsi une dégradation de l'ADN nucléaire et des changements morphologiques typiques de la cellule apoptotique [40, 60, 63, 117, 133].

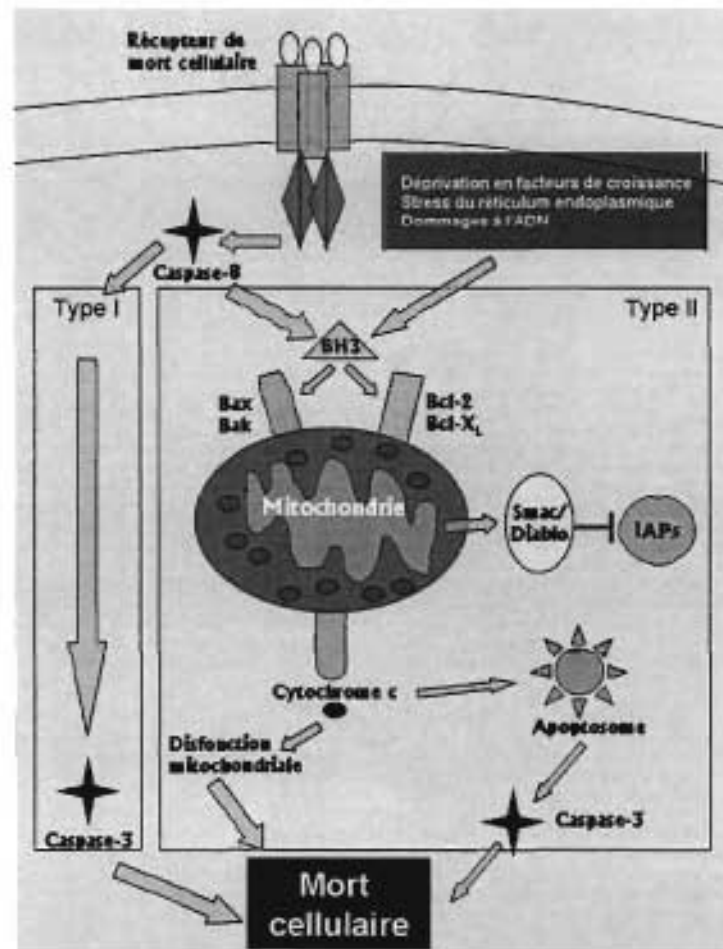


**Figure 3: La cascade des caspases.** Un des événements précoces de l'activation de la cascade des caspases est la formation de l'apoptosome qui permet l'activation de la caspase 9. Les caspases 3 et 7 semblent ensuite être activées simultanément par la caspase 9. L'activation de la caspase 3 permet à son tour l'activation des caspases 2 et 6 puis des caspases 9 et 10.

### 2.2.1 La voie extrinsèque

La voie extrinsèque de l'apoptose est souvent appelée la voie des récepteurs de mort cellulaire du fait que c'est la liaison entre un récepteur à la surface de la cellule et son ligand qui enclenche le processus. L'enclenchement de l'apoptose se fait quand un ligand se lie sur la portion N-terminale extracellulaire du récepteur. Ceci mène à la trimérisation du récepteur et son activation. Il y a alors recrutement de protéines, dont certaines procaspases initiatrices, via la portion c-terminale cytoplasmique du récepteur. En fonction du type cellulaire, l'activation des

récepteurs de mort résultera en une activation directe de caspases effectrices ou encore à l'activation de Bid et au relargage subséquent de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux [52, 138] (Figure 4).



**Figure 4: Les voies extrinsèques de la mort cellulaire.** Dans la voie extrinsèque, un récepteur enclenche le processus de mort cellulaire. La voie extrinsèque implique l'activation des protéines BH3 de la famille des Bcl-2 et le largage de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie.

### 2.2.2 La voie intrinsèque

Alors que la voie extrinsèque est déclenchée par des facteurs extérieurs à la cellule, la voie intrinsèque a pour éléments déclencheurs des insultes intracellulaires, comme l'augmentation du niveau de ROS, des dommages à l'ADN, un stress originant du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes et des dommages

mitochondriaux [138]. Via diverses voies de signalisation intracellulaire, ces insultes convergent vers la mitochondrie et exercent différents effets dont le plus important dans le processus d'induction de la mort cellulaire est l'augmentation soudaine de la perméabilité des membranes mitochondriales (Figure 5). Cette perméabilisation engendre plusieurs effets délétères notamment la perte du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\psi$ ), le découplage de la chaîne respiratoire et la relâche de plusieurs facteurs pro-apoptotiques résidant normalement dans la mitochondrie, incluant le cytochrome c, AIF, SMAC/DIABLO, l'endonucléase G la sérine-protéase OMI/Htr A2 et possiblement plusieurs pro-caspases [62, 69, 73]. Ces protéines agissent à différents niveaux dans la cascade d'activation de l'apoptose (Figure 5). Le cytochrome c se lie au facteur protéique associé à l'apoptose (APAF-1) et à la pro-caspase 9 pour former l'apoptosome permettant ainsi l'activation de la caspase 3 effectrice [126]. Le facteur d'induction de l'apoptose (AIF) [128] et l'endonucléase G [88] migrent vers le noyau et entraînent la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN nucléaire. SMAC/DIABLO [2] et OMI/Htr A2 ont quant à elles une action inhibitrice sur les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP et XIAP) dont le rôle est de limiter la formation de l'apoptosome.

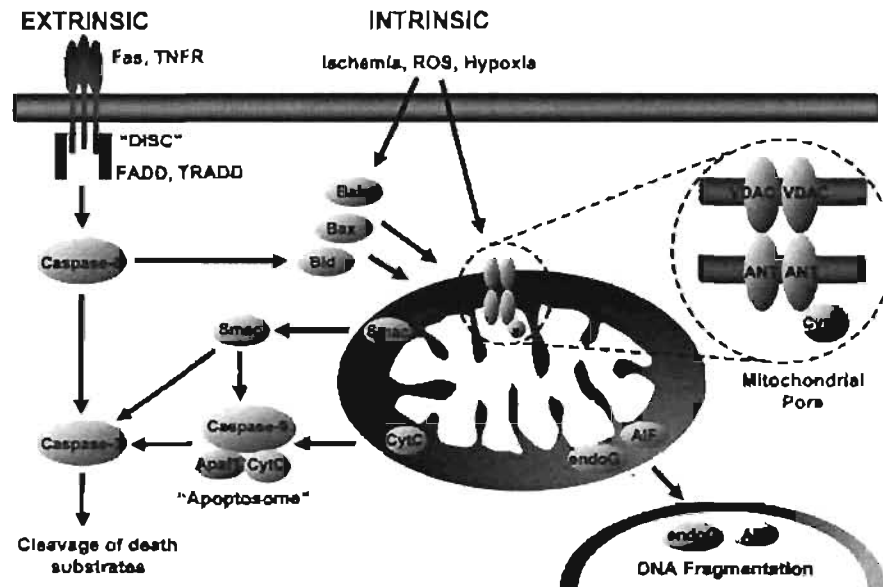


Figure 5: Représentation schématique des voies de mort cellulaire intrinsèque et extrinsèque qui régulent l'apoptose chez le mammifère (Baines et Molkenin 2005).

Les mécanismes de perméation mitochondriale, bien qu'encore mal connus, semblent multiples. Les deux grands mécanismes documentés sont :

1. La formation de pores protéiques par les membres pro-apoptotiques 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.

### 2.3 Mécanismes de perméabilisation des membranes mitochondriales

#### 2.3.1 La famille des Bcl-2

La famille des protéines des lymphomes 2 à cellules B (Bcl-2) est composée de protéines 1) anti-apoptotiques (*i.e.*, Bcl-2 and Bcl<sub>XL</sub>), et 2) pro-apoptotiques [42, 50], ces dernières étant subdivisées en protéines pro-apoptotiques à a) domaines multiples (*i.e.* Bak, Bax) ou à b) domaine BH3 (*i.e.* Bid, Bad, Bim, Bmf, Noxa, Puma, BNip3 et Nix). Le mécanisme central dans ce type de perméabilisation est le changement de conformation et l'activation des protéines multi-domaines Bax et Bak. Ce processus permet leur oligomérisation et leur insertion dans la membrane

mitochondriale externe, menant à la perméabilisation et à la relâche de facteurs pro-apoptotiques (Figure 5). Bax est normalement localisée dans le cytosol sous sa forme inactive et migre à la mitochondrie en réponse à des stimuli apoptotiques [28]. Bak est quant à elle présente de manière constitutive dans la membrane mitochondriale externe, mais est maintenue sous sa forme inactive, présumément via sa liaison avec VDAC2. La formation d'oligomère Bax/Bak est favorisée par les protéines à domaine BH3 qui sont couplées à des cascades de signalisation et agissent comme relais pour activer la perméabilisation mitochondriale suite à des signaux apoptotiques. À titre d'exemple, il est connu que la protéine Bid est clivée en tBid en condition de stress comme l'ischémie-réperfusion, ce qui cause sa migration à la mitochondrie où elle facilite l'action de Bak. L'activation de Bad semble également exercer le même genre de rôle facilitateur sur Bak. Par ailleurs, l'action de ces protéines pro-apoptotiques est antagonisée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl<sub>XL</sub>. Ces protéines résident en permanence dans la membrane mitochondriale externe et inhibent la perméabilisation probablement en formant des dimères avec Bax et Bak, inhibant ainsi leur oligomérisation [76].

### 2.3.2 Le PTP

La transition de perméabilité a été initialement décrite sur des mitochondries isolées comme une augmentation soudaine de la perméabilité aux solutés en présence de fortes concentrations de Ca<sup>2+</sup> [86, 94, 95]. Bien que ce phénomène ait initialement été attribué à un dommage membranaire non spécifique, il est maintenant reconnu que l'ouverture du PTP, un canal non spécifique de haute conductance localisé dans la membrane mitochondriale interne, en est responsable [175]. L'ouverture prolongée du PTP permet l'équilibration des solutés de 1 500 Da et moins de part et d'autre de la membrane. Ceci engendre plusieurs conséquences importantes dont la perte de  $\Delta\Psi$ , le découplage de la chaîne respiratoire, et une hydrolyse massive de l'ATP

causée par le fonctionnement en mode réverse de l'ATP synthase. À tout le moins *in vitro* sur mitochondries isolées et incubées dans des tampons à base de sucrose ou de KCl, l'ouverture du PTP engendre également un gonflement de la matrice mitochondriale qui est substantiel compte tenu que la membrane interne, avec sa grande surface et ses nombreux replis, possède une grande capacité d'accommodement. En contrepartie, puisque la surface de la membrane externe est beaucoup moindre, ce gonflement matriciel engendre éventuellement la rupture de la membrane externe et la relâche des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux mentionnés précédemment.

Dans plusieurs types de cellules et particulièrement dans les cardiomyocytes, la majeure partie de la production d'ATP est assurée par les mitochondries. Compte tenu des effets catastrophiques de l'ouverture du PTP sur l'équilibre énergétique, son ouverture massive et prolongée a surtout été mise en cause dans la nécrose [43, 161]. Cependant, il existe des indices indiquant qu'une ouverture momentanée ou dans un nombre de mitochondries insuffisant pour induire une catastrophe énergétique pourrait constituer un mécanisme d'activation de l'apoptose dépendant du PTP [43, 161].

### **2.3.2.1 Régulation du PTP**

La régulation de l'ouverture du PTP, qui est complexe et implique un grand nombre de modulateurs est assez bien caractérisée (voir tableau I pour un sommaire). L'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice est l'activateur principal de l'ouverture du PTP [44, 49, 176]. Cependant, plusieurs autres facteurs facilitent l'ouverture du PTP notamment en augmentant sa sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ . La présence de phosphate inorganique, la baisse du potentiel de membrane, le stress oxydant, l'oxydation des nucléotides pyrimidiques (NADH et NADPH), l'alcalinisation de la matrice ( $\text{pH} >$



7,6), le flux d'électrons au niveau du complexe I ainsi que la déplétion des réserves endogènes en nucléotides adénylés, particulièrement l'ADP et l'ATP, sont tous des facteurs qui favorisent l'ouverture du PTP. À l'opposé plusieurs cations divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ ), et possiblement certains cations mono ou trivalents, inhibent l'ouverture du PTP probablement en agissant comme antagonistes compétitifs du  $Ca^{2+}$  [8, 18, 86, 163]. Par ailleurs, il a également été démontré que Bid et Bax favorisent l'ouverture du PTP alors que Bcl-2 et Bcl<sub>XL</sub> l'inhibent [42, 50, 79, 165].

L'ouverture du PTP peut être modulée par une variété d'agents pharmacologiques qui sensibilisent ou désensibilisent le pore à l'ouverture en réponse à un stimulus inducteur donné. Ces agents agissent souvent de manière indirecte en affectant un ou plusieurs des facteurs favorisant l'ouverture du PTP [175]. C'est le cas notamment d'agents antioxydants et d'inhibiteurs du transport mitochondrial du  $Ca^{2+}$  comme le rouge de ruthenium. Cependant, en 1988, l'équipe de Martin Crompton a rapporté que la cyclosporine-A, un agent immuno-supresseur utilisé pour le traitement du rejet de greffe post-transplantation, inhibait de manière spécifique l'ouverture du PTP à des concentrations inférieures à 1  $\mu M$  [48]. Cette découverte a permis par la suite de grandes avancées dans l'étude de la structure moléculaire du PTP incluant l'identification de la cyclophiline D (CypD), une protéine matricielle de 18 KDa à laquelle se lie spécifiquement la CsA pour inhiber son interaction avec d'autres composantes protéiques du pore [82].

**Tableau I: Régulation de l'ouverture du PTP par différents effecteurs physiologiques**

Agent/point de contrôle	Probabilité d'ouverture du PTP	Référence
Ca <sup>2+</sup> matriciel	Augmentée	[59, 86, 94, 95]
Mg <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> matriciel	Diminuée	[86, 94, 95]
Oxydants	Augmentée	[45]
ATP	Diminuée	[59]
ADP	Diminuée	[47]
Cyclosporine A (CsA)	Diminuée	[48]
pH matriciel	Une diminution du pH diminue la probabilité	[18]
P <sub>i</sub>	Augmentée	[86, 94, 95]
Potentiel de surface	Une réduction entraîne une diminution de la probabilité	[22]
Voltage	Une augmentation du voltage entraîne une diminution de la probabilité	
Bax, Bid	Augmentée	[42, 50, 79, 165]
Bcl-2, Bcl <sub>XL</sub>	Diminuée	

### 2.3.2.2 Structure du PTP

Malgré la découverte de la CsA et la caractérisation fonctionnelle détaillée du PTP, son identité moléculaire n'est pas encore clairement établie et suscite de vifs débats [9, 17, 176]. Cependant, il est assez bien admis que le PTP est composé de plusieurs protéines qui jouent des rôles spécifiques en condition physiologique normale et qui en condition de stress s'assemblent pour former des canaux non spécifiques à haute conductance.

L'hypothèse la plus populaire et la mieux documentée jusqu'à maintenant est que le PTP serait constitué de trois unités principales : l'échangeur ATP/ADP

(ANT), la porine (VDAC) et la cyclophiline-D. Ces protéines formeraient des complexes au niveau des sites de contacts entre les membranes interne et externe auxquels s'associeraient d'autres protéines incluant plusieurs kinases, certains membres de la famille Bcl-2 ainsi que le récepteur à la benzodiazépine [43]. Cette hypothèse est basée principalement sur le fait que:

- l'ouverture du PTP est régulée par des ligands de l'ANT et de CypD [153].
- l'ANT, VDAC ou des complexes ANT-VDAC-CypD isolés et reconstitués dans des liposomes ou dans une bi-couche de phospholipides présentent certaines des caractéristiques de conductance et de régulation du PTP [175].

Cependant une faiblesse de ces études est que CypD se lie à plusieurs protéines outre ANT [17] et qu'il est impossible de déterminer si ANT et VDAC, et non d'autres protéines isolées conjointement, sont celles qui présentent les caractéristiques du PTP une fois reconstituées dans les membranes artificielles. Des études récentes utilisant des stratégies transgéniques avec lesquelles les gènes de ces protéines ont été sélectivement inactivés démontrent que la composition moléculaire du PTP est probablement plus compliquée.

En effet, le groupe de Wallace a récemment démontré qu'il était possible d'induire l'ouverture du PTP par surcharge calcique sur des mitochondries isolées à partir du foie de souris transgéniques présentant une délétion des deux isoformes de l'ANT [107]. Cette étude suggère donc qu'en l'absence d'ANT d'autres protéines peuvent se substituer pour former le PTP lorsque les mitochondries sont soumises à un stress calcique. Cependant, la quantité de  $Ca^{2+}$  requise pour ouvrir le PTP dans

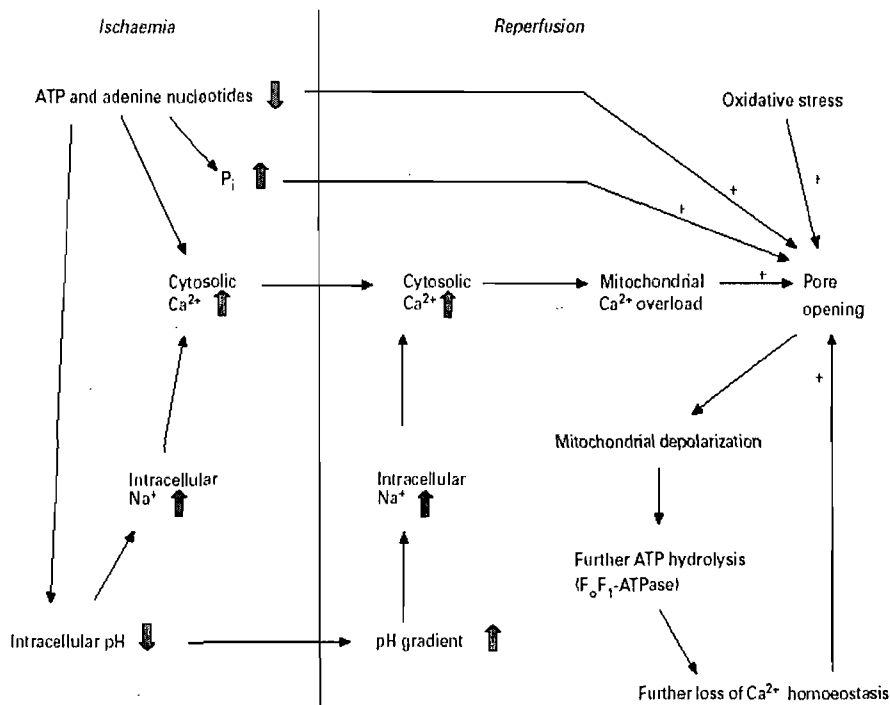
ces mitochondries était deux à trois fois plus importante que la quantité requise dans les mitochondries des souris contrôles. De plus, en absence d'ANT, la régulation du PTP par des ligands de l'ANT tels que l'atractyloside et l'acide bonkrekique était abolie. Par contre, l'ouverture du PTP était encore sensible à la CsA, indiquant que la liaison de la CypD à d'autres protéines que l'ANT peut réguler l'ouverture du PTP. Dans l'ensemble, ces données suggèrent donc que l'ANT n'est pas la seule protéine capable de former le PTP mais qu'elle participe probablement à titre de protéine régulatrice ou comme composante intégrale du pore lorsqu'elle est exprimée normalement. En ce qui a trait à VDAC, une étude publiée par le groupe de Molkenkin cette année a démontré que la susceptibilité à l'ouverture du PTP en réponse au  $Ca^{2+}$  et au stress oxydant était similaire en absence ou en présence des trois isoformes de VDAC, suggérant clairement que VDAC n'est ni une protéine constituante ni un régulateur du PTP [10].

Par ailleurs, plusieurs groupes de recherche, dont ceux de Molkenkin, Bernardi et Korsmeyer ont généré des souris présentant une délétion du gène de la cyclophiline D (souris  $Ppif^{-/-}$ ) [9, 12, 152]. Toutes ces études ont rapporté que l'ouverture du PTP était possible dans les mitochondries isolées à partir du foie des souris  $Ppif^{-/-}$  [9, 12]. Cependant, la quantité de  $Ca^{2+}$  requise pour y arriver était significativement supérieure à celle qui était requise pour ouvrir le PTP dans les mitochondries provenant des souris contrôles. De plus, l'effet inhibiteur de la CsA était absent dans les mitochondries  $Ppif^{-/-}$ , confirmant que la CypD est bel et bien la cible de la CsA [9, 12]. Cependant, la régulation du PTP par des modulateurs qui ne dépendent pas de la CypD était similaire dans les mitochondries provenant des souris contrôles et  $Ppif^{-/-}$  [12]. Ces études ont également démontré que l'absence de CypD causait une diminution de la mort cellulaire induite par le stress oxydant et

l'ischémie-réperfusion [9, 134] et qu'à l'opposé, sa surexpression était associée à l'activation de la voie mitochondriale de la mort cellulaire caractérisée par une relâche accrue de cytochrome c, l'activation de la caspase 9 et l'apparition de fragmentation de l'ADN nucléaire [9]. Prises dans leur ensemble ces études ont mené à la suggestion que la CypD est probablement une protéine régulatrice plutôt qu'une composante structurale du PTP.

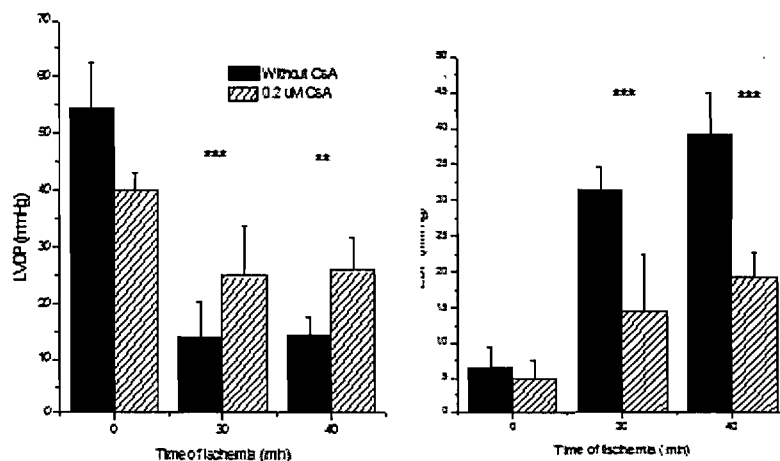
### **3 RÔLE DU PTP DANS LE DOMMAGE ISCHÉMIQUE AU NIVEAU DU COEUR**

Dans le cœur, l'ischémie-réperfusion est la situation dans laquelle le rôle de l'ouverture du PTP dans la dysfonction et le dommage cellulaire est maintenant bien établi. Initialement, cette hypothèse a été suggérée après la constatation que plusieurs des conditions requises pour ouvrir le PTP *in vitro* (tableau I section 2.3.2.1) sur mitochondries isolées prévalent dans les cardiomyocytes à la suite d'une période d'ischémie (Figure 6)[49].



**Figure 6: Facteurs contribuant à l'ouverture du PTP suite à l'ischémie-réperfusion.** Le manque d'oxygène et de substrats énergétiques entraîne une abolition de l'oxydation phosphorylante, une diminution rapide du contenu en ATP ainsi que l'accumulation de  $P_i$  de  $H^+$  et de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Lors de la réperfusion, la repolarisation partielle des mitochondries permet une accumulation importante de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie. Par ailleurs, le rétablissement du flux d'électrons au niveau des complexes de la chaîne respiratoire qui ont été endommagés au cours de l'ischémie engendre une augmentation de la production de radicaux libres. L'ensemble de ces facteurs crée un environnement hautement favorable à l'ouverture du PTP. Adapté de (Crompton 1999).

L'utilisation de CsA sur le cœur isolé perfusé ou sur des cardiomyocytes isolés soumis à l'ischémie-réperfusion a par la suite apporté un support important à cette hypothèse. En effet, plusieurs effets bénéfiques de la CsA ont été rapportés incluant une meilleure récupération de la pression ventriculaire systolique [74] (Figures 7 et 11) et de l'équilibre des adénylates [74] (Figure 8), une diminution de l'hypercontracture [74] et une réduction de la taille de la zone nécrotique [84] (Figure 9) suite à l'I-R. De plus, l'administration de CsA durant l'I-R a été associée à une diminution de la relâche de cytochrome c (Figure 10) et une atténuation des dysfonctions respiratoires mesurées sur les mitochondries isolées à l'issue de la réperfusion [20].



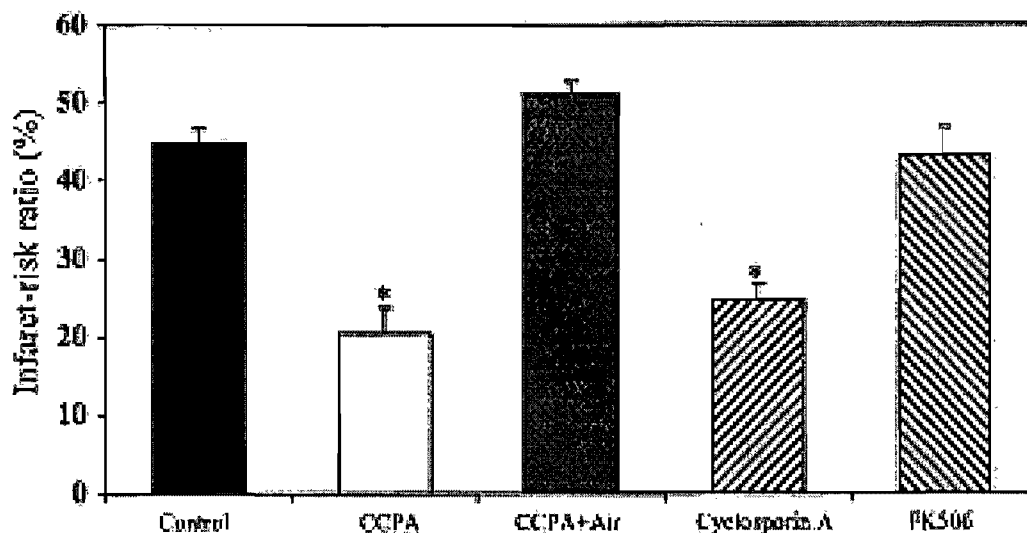
**Figure 7: Effet de la CsA sur la fonction contractile du cœur soumis à une ischémie-réperfusion.** La figure présente la pression développée par le ventricule gauche (LVDP) et la pression diastolique (EDP) lors de la 15<sup>e</sup> minute de réperfusion suivant une ischémie de 30 ou 40 minutes en présence ou en absence de CsA. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. (\*\* P<0,02, \*\*\* P<0,01). Adapté de (Griffiths et al 1993).

Cependant, une des limites inhérentes à l'utilisation de la CsA sur l'organe ou la cellule entière est que la CsA inhibe également la calcineurine, une phosphatase  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante cytosolique, qui peut être impliquée dans la mort cellulaire [58, 143], ce qui ne permet pas de conclure hors de tout doute que l'effet bénéfique de la CsA est exclusivement relié à l'inhibition du PTP. Cependant, plusieurs études ont maintenant démontré que l'effet de la CsA est médié par l'inhibition du pore. En effet, l'administration de FK-506, un inhibiteur de la calcineurine qui n'affecte pas l'ouverture du PTP, s'est avéré inefficace pour réduire la taille de l'infarctus [84] (Figure 9), et des témoins de l'activation de l'apoptose tels que la relâche de cytochrome c (Figure 10), l'activation des caspases ainsi que la fragmentation de l'ADN nucléaire [20]. De plus, plusieurs analogues de la CsA tels que la N-méthyl-valine cyclosporine (Met-Val-CsA) [58], la N-méthyl-isoleucine-cyclosporine (NIM811) [170] et la sanglifehrin A [36], qui ont des effets inhibiteurs sur le PTP mais n'interagissent pas avec la calcineurine, se sont avérés d'une efficacité comparable à la CsA (Figures 11 et 12).

TABLE 1. Adenine nucleotide levels in ischemic/reperfused hearts  $\pm$  cyclosporin A

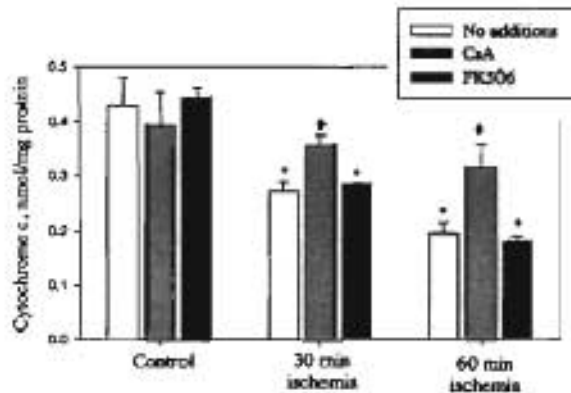
	n	ATP	ADP	AMP	ATP+ADP+ AMP	ATP/ADP
(μmoles/g wet wt.)						
30 min normal	6	2.86 ± 0.12	0.65 ± 0.05	0.13 ± 0.01	3.64 ± 0.28	4.49 ± 0.28
15 min normal + 15 min 1 μM Cy-A	6	2.91 ± 0.18	0.71 ± 0.07	0.18 ± 0.02	3.69 ± 0.23	4.04 ± 0.25
30 min ischaemia	6	0.67 ± 0.07	0.52 ± 0.06	1.32 ± 0.11	2.51 ± 0.18	1.39 ± 0.22
30 min ischaemia + 1 μM Cy-A	5	0.87 ± 0.07	0.71 ± 0.03	1.40 ± 0.11	2.99 ± 0.09	1.25 ± 0.13
30 min ischaemia/ 15 min reperfusion	22	1.11 ± 0.05	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.06	1.93 ± 0.08	2.76 ± 0.14
0.2 μM Cy-A ischaemia + reperfusion	6	1.49 ± 0.23 <sup>1</sup>	0.34 ± 0.04	0.17 ± 0.03 <sup>2</sup>	1.99 ± 0.25	4.34 ± 0.39 <sup>2</sup>
0.2 μM Cy-A on reperfusion only	5	1.53 ± 0.16 <sup>2</sup>	0.47 ± 0.05	0.33 ± 0.07	2.32 ± 0.17	3.42 ± 0.43
0.2 μM Cy-A in ischaemia only	5	0.93 ± 0.17	0.47 ± 0.04	0.41 ± 0.07	1.87 ± 0.10	1.92 ± 0.31

**Figure 8: Effet de la CsA sur le contenu cardiaque en nucléotides adénylés suivant une période d'ischémie-réperfusion.** Le tableau présente le contenu en nucléotides adénylés et le ratio ATP/ADP mesuré par HPLC sur le tissu cardiaque congelé à l'issue des protocoles de perfusion indiqués. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. A été considéré comme statistiquement significatif <sup>1</sup>P<0,05; <sup>2</sup>P<0,01 vs I-R sans CsA. Adapté de (Griffiths et al 1993).

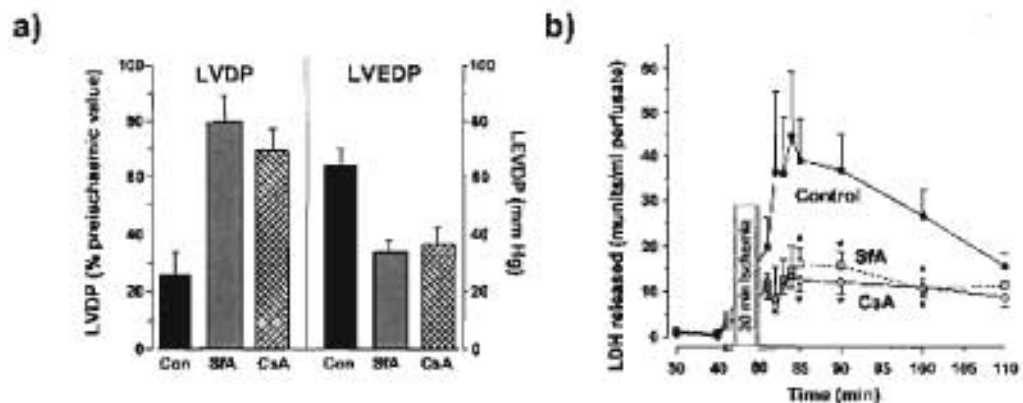


**Figure 9: Effet de la CsA sur la taille de la zone nécrotique induite par l'ischémie-réperfusion.** L'administration de CsA et d'un agoniste du récepteur A1 de l'adénosine (CCPA) diminue de façon importante la taille de l'infarctus. L'administration de FK-506, un inhibiteur de la calcineurine qui n'affecte pas l'ouverture du PTP est sans effet sur la taille de l'infarctus. De plus, l'ajout d'attractyloside (Atr), un inducteur du PTP qui se lie à l'ANT abolit l'effet protecteur du CCPA. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. \*: significativement différent de la condition contrôle (\*P<0,0001). Adapté de (Hausenloy et al. 2002).

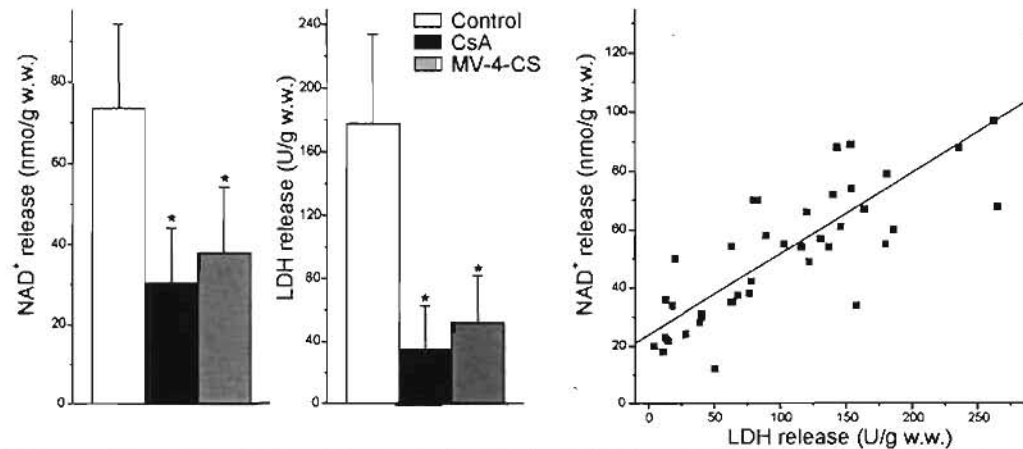




**Figure 10: Effet de la CsA sur le contenu mitochondrial en cytochrome c après une période d'ischémie.** La CsA diminue la quantité de cytochrome c relâché par les mitochondries cardiaques durant l'ischémie. Cependant, le FK-506, un inhibiteur de la calcineurine est sans effet. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. \* : significativement différent vs contrôle dans la même condition expérimentale ( $P < 0,01$ ); # : Significativement différent la condition sans traitement dans la même condition de perfusion ( $P < 0,05$ ). Adapté de (Borutaite et al. 2003).



**Figure 11: Effet de la CsA et de la Sangliféhrin-A, un analogue non immunosuppresseur sur la fonction contractile et le dommage tissulaire suite à une période d'ischémie-réperfusion.** La Sangliféhrin-A (SfA) et la CsA protègent le cœur ischémié lors de la réperfusion. Les cœurs de rats ont été perfusé en mode Langendorff. Après 50 minutes le cœur a été soumis à une ischémie de 30 minutes.  $0,2\mu\text{M}$  de CsA ou  $1\mu\text{M}$  de SfA a été ajouté 3 ou 10 min avant l'ischémie. (A) Les valeurs de LVDP et de LVEDP post-ischémie sont significativement différentes ( $p < 0,001$ ) dans les groupes CsA et SfA vs le groupe contrôle. (B) La relâche de LDH post-ischémie est significativement différente (\*  $p < 0,05$ ) dans les groupes CsA et SfA vs le groupe contrôle (Clarke et al 2002).



**Figure 12: Effet de la CsA et de la Methyl-Valine-4-Cyclosporine, un analogue non immunosuppresseur sur le dommage tissulaire et l'ouverture du PTP suite à une ischémie-réperfusion cardiaque.** La CsA réduit la relâche dans l'effluent coronarien du NAD<sup>+</sup>, un marqueur de l'ouverture du PTP, ainsi que celle de la LDH lors de la réperfusion. Des échantillons de 1mL de perfusats ont été collectés à chaque minute durant les cinq premières minutes de réperfusion puis à un intervalle de cinq minutes par la suite. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart type (n=6 par groupe) de la quantité totale relâchée durant la période de réperfusion. La CsA ou la MV-4-CS (0,2  $\mu$ M) était présente durant tout le protocole de perfusion. \* : Significativement différent des cœurs non traités ( $p < 0,01$ ) (Di Lisa et al 2001).

### 3.1 Quantification de l'ouverture du PTP sur le cœur entier

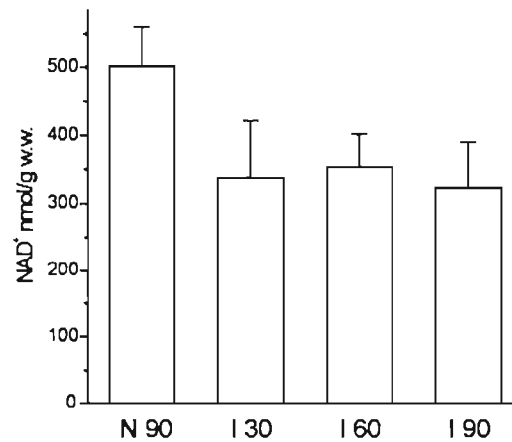
Une des limites des approches pharmacologiques utilisées dans l'ensemble de ces études est que les effets bénéfiques sur la fonction et le dommage tissulaire sont attribués à une inhibition de la perméabilité transitionnelle sans toutefois pouvoir le confirmer à l'aide d'une quantification directe de l'ouverture du PTP [58]. Cependant, la mise au point de deux méthodes permettant la quantification de l'ouverture du PTP sur le cœur entier a permis de s'affranchir de cette limite. Ces deux méthodes sont la mesure de la relâche de NAD<sup>+</sup> et celle de la séquestration mitochondriale du 2-[<sup>3</sup>H]-deoxyglucose. Étant donné que les travaux présentés dans ce mémoire ont nécessité la quantification *in situ* de l'ouverture du PTP, les principes ainsi que les principaux résultats obtenus à l'aide de chacune d'elles sont présentés dans cette section.

### 3.1.1 Relâche de NAD<sup>+</sup>

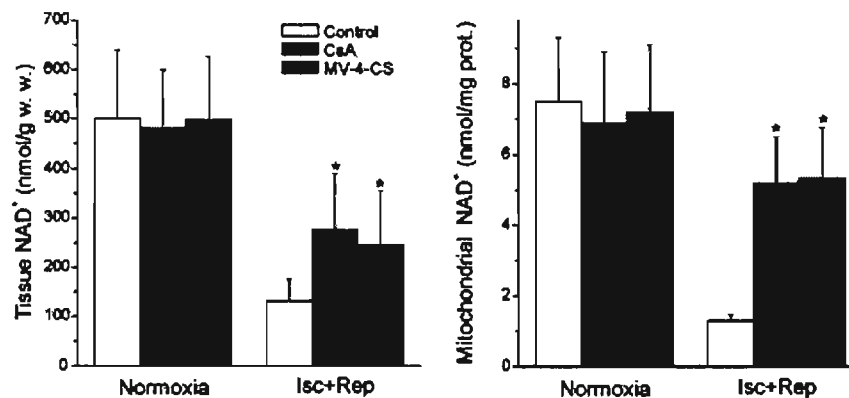
Le NAD<sup>+</sup> est un transporteur d'électrons solubles qui, bien que présent dans le cytosol, est exprimé en quantités beaucoup plus abondantes dans la matrice mitochondriale. Compte tenu de son poids moléculaire, le NAD<sup>+</sup> sort de la matrice mitochondriale suite à l'ouverture du PTP. Une fraction du NAD<sup>+</sup> relâché est immédiatement dégradée par une NAD<sup>+</sup> glycohydrolase qui est vraisemblablement située dans l'espace membranaire à la surface externe de la membrane interne [58]. Le NAD<sup>+</sup> qui échappe à cette enzyme est quant à lui relâché dans le cytosol et éventuellement dans la circulation coronaire dans les cas où l'intégrité du sarcolemme est compromise.

Une seule étude a utilisé la relâche de NAD<sup>+</sup> pour investiguer le rôle de l'ouverture du PTP dans le dommage ischémique cardiaque. Dans cette étude, des cœurs isolés et perfusés en mode Langendorff ont été soumis à une ischémie globale de 30, 60 ou 90 minutes, suivie par une réperfusion de 30 minutes. Le contenu en NAD<sup>+</sup> a été mesuré à intervalle régulier dans le perfusat coronarien et les cœurs étaient homogénéisés et les mitochondries isolées à la fin de la réperfusion. Le contenu en NAD<sup>+</sup> a également été mesuré par technique fluorimétrique dans l'homogénat total ainsi que dans la fraction mitochondriale. Dans les cœurs soumis à une ischémie de 30 à 90 minutes, le contenu tissulaire et mitochondrial en NAD<sup>+</sup> était diminué de 30% comparativement aux valeurs contrôles obtenus dans les cœurs non ischémiques (Figure 13). Ceci était accompagné d'une relâche notable de NAD<sup>+</sup> dans le perfusat coronaire (Figure 12). De plus, ces phénomènes étaient significativement atténués chez les cœurs perfusés en présence de CsA ou de son analogue la n- Méthyl-Valine-4-Cyclosporine. Les auteurs ont également démontré

une corrélation positive entre la quantité de  $\text{NAD}^+$  relâchée dans l'effluent coronaire et le dommage tissulaire (tel que mesuré par la relâche de LDH) (Figures 12 et 14).



**Figure 13: Effet d'une ischémie sur le contenu en  $\text{NAD}^+$  dans le coeur de rat.** Les coeurs de rats perfusés *ex vivo* en mode Langendorff ont été soumis à une ischémie globale de 30, 60 ou 90 min. Le contenu tissulaire en  $\text{NAD}^+$  a été mesuré par technique fluorimétrique sur l'homogénat total traité à l'acide perchlorique puis neutralisé à pH 7,0. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart type de six expériences. N 90 sont des perfusions normoxiques de 90min. Adapté de (Di Lisa et al 2000).

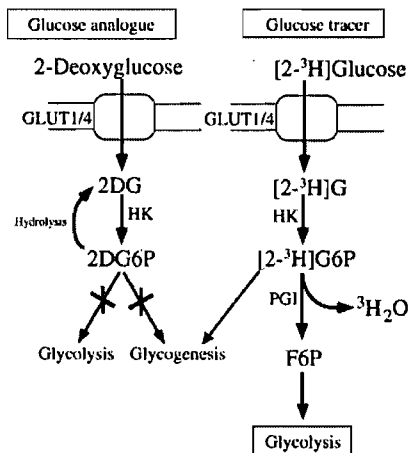


**Figure 14: Effet de la CsA et de la Methyl-Valine-4-Cyclosporine, un analogue non immunosupresseur sur le contenu tissulaire et mitochondrial en  $\text{NAD}^+$ .** Les figures montrent que la CsA et la MeVal-4-Cs atténuent de manière significative la perte de  $\text{NAD}^+$  tissulaire et mitochondrial associée à l'ouverture du PTP dans les coeurs perfusés *ex vivo* soumis à une période d'ischémie de 90 minutes suivi d'une réperfusion de 30 minutes. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart type de six expériences par groupe expérimental. \* : Significativement différent des coeurs non traités soumis à l'I-R. Adapté de (Di Lisa et al 2000).

Par ailleurs, les auteurs n'ont pas rapporté les résultats obtenus pour des périodes d'ischémie plus courtes (*i.e.* 30 min) qui sont plus communément observées. Bien que les auteurs ne se soient pas attardés à la question, des études non publiées menées dans notre laboratoire suggèrent que ceci pourrait être dû au fait que cette méthode ne permet pas de détecter l'ouverture du PTP dans des conditions moins sévères d'I-R. En effet, la méthode de mesure fluorimétrique du  $\text{NAD}^+$  est peu précise en raison d'un faible rapport signal/bruit. Lors d'expériences au cours desquelles les cœurs ont été soumis à 30 minutes d'ischémie et 40 minutes de réperfusion nous avons donc été incapables de détecter des changements reproductibles du contenu mitochondrial et tissulaire en  $\text{NAD}^+$ . De plus, compte tenu de la faible concentration tissulaire en  $\text{NAD}^+$  et de l'absence de nécrose généralisée suite à une insulte de cette ampleur, la quantité de  $\text{NAD}^+$  relâchée dans le perfusé coronaire était en deçà de la limite de détection. Globalement cette technique, bien que valide, semble donc limitée par sa faible sensibilité.

### 3.1.2 Séquestration mitochondriale du [ $^3\text{H}$ ]-DOG

La seconde technique utilisée pour quantifier l'ouverture du PTP *in situ* sur le cœur entier est celle de la séquestration mitochondriale du 2- $^3\text{H}$ -deoxyglucose ( $^3\text{H}$ -DOG). Le  $^3\text{H}$ -DOG est un analogue du glucose qui entre dans la cellule par l'intermédiaire des transporteurs du glucose et est phosphorylé en 2-déoxyglucose-6-phosphate ( $^3\text{H}$ -DOG-6P) par l'hexokinase. Le  $^3\text{H}$ -DOG-6P étant métabolisé par des phosphatases non spécifiques à une vitesse largement inférieure à son entrée dans la cellule, il s'accumule dans le cytosol en quantités proportionnelles à la concentration extracellulaire de  $^3\text{H}$ -DOG [72, 168] (Figure 15).



**Figure 15: Métabolisme du désoxyglucose :** La dégradation du  $[^3\text{H}]\text{-DOG-6P}$ , via une déphosphorylation non spécifique, se fait lentement en comparaison avec son entrée dans la cellule, permettant ainsi une accumulation notable de  $[^3\text{H}]\text{-DOG-6P}$  dans le cytosol (Hopkins et al. 2004).

Cette accumulation constitue un facteur important permettant d'augmenter le rapport signal/bruit et donc d'obtenir une mesure sensible de l'ouverture du PTP. Par ailleurs, l'accumulation trop importante de  $[^3\text{H}]\text{-DOG-6P}$  peut entraîner une séquestration du pool cellulaire de  $\text{P}_i$  et mener à une déplétion des réserves d'ATP et de phosphocréatine. Cependant, il a été démontré que cet effet indésirable se manifestait seulement lorsque la concentration de  $[^3\text{H}]\text{-DOG}$  utilisée était supérieure à 2 mM [91, 93]. Or la concentration qui est habituellement utilisée pour la mesure de l'ouverture du PTP est de 0,5 mM.

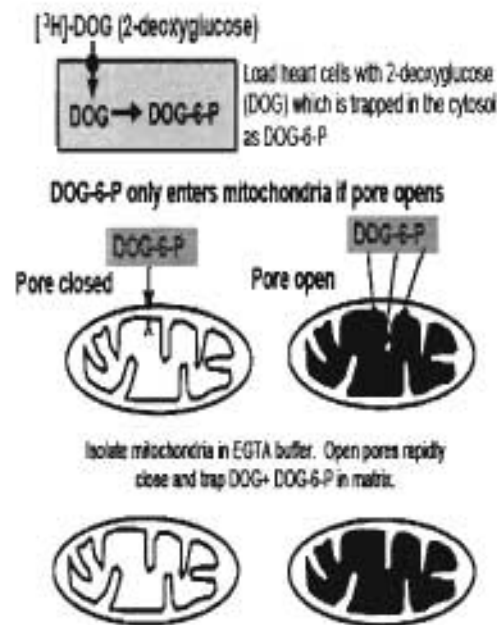
Il est bien connu que la perméabilité des membranes mitochondriales aux sucres est faible. En effet, lorsque des mitochondries normales sont incubées en présence de  $^{14}\text{C}$ -mannitol, seulement un faible pourcentage est incorporé, ce qui représente 10-15 % de la quantité maximale attendue après une équilibration complète [171]. En conditions normoxiques, l'incorporation de  $[^3\text{H}]\text{-DOG-6P}$  dans le compartiment mitochondrial est donc relativement faible. À l'opposé, puisque l'ouverture du PTP mène à une équilibration des solutés de 1 500 Da et moins, une

des techniques de mesure communément utilisée *in vitro* est d'incuber les mitochondries en présence d'un tampon à base de sucrose et de quantifier le gonflement mitochondrial secondaire à l'entrée de sucrose et d'eau dans la matrice. Cette propriété assure donc une incorporation marquée du [<sup>3</sup>H]-DOG-6P dans le compartiment mitochondrial suite à l'ouverture du PTP dans l'organe entier (Figure 15).

Un autre aspect important pour la quantification adéquate de l'ouverture du PTP est que le [<sup>3</sup>H]-DOG-6P demeure dans le compartiment mitochondrial après l'ouverture du pore. De plus, pour que les résultats soient représentatifs, l'incorporation de [<sup>3</sup>H]-DOG-6P causée par l'ouverture accidentelle du PTP lors de la procédure d'isolation doit être minimisée. De manière à atteindre ces objectifs, le groupe de Halestrap a proposé l'utilisation d'une procédure écourtée pour l'isolation des mitochondries et d'inclure une forte concentration d'EGTA (2 mM) dans les tampons utilisés pour l'homogénéisation des tissus et l'isolation des mitochondries de manière à chélater le Ca<sup>2+</sup>. Cette suggestion est basée sur le fait qu'*in vitro*, l'ajout d'EGTA à des mitochondries dont le PTP a préalablement été ouvert cause sa fermeture et une récupération fonctionnelle [46] (Figure 16).

### 3.1.2.1 Protocole de perfusion

La figure 16 présente le protocole qui a été utilisé par le groupe de Halestrap pour quantifier la séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG sur des cœurs perfusés *ex vivo* en mode Langendorff.



**Figure 16: Principe de la méthode de séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG.** Adapté de (Halestrap et al. 2004).

Après l'instrumentation des cœurs pour les mesures fonctionnelles, ceux-ci sont perfusés en circuit ouvert (le tampon de perfusion n'est pas re-recirculé) avec un tampon Krebs-Henseleit (K-H). Après une brève période de stabilisation, les cœurs sont perfusés pendant 20 min en mode recirculant avec 40 mL d'un tampon K-H contenant 0,5 mM de [<sup>3</sup>H]-DOG (0,1  $\mu$ Ci/mL). À l'issue de cette période de chargement, les cœurs sont de nouveau perfusés en circuit ouvert pendant une courte période (5-15 min) avec le tampon K-H normal, de manière à éliminer le [<sup>3</sup>H]-DOG extracellulaire résiduel. Le protocole d'ischémie-réperfusion est ensuite administré, après quoi les cœurs sont rapidement homogénéisés pour l'isolation des mitochondries et la mesure de la radioactivité. Bien que ce protocole ait été utilisé avec succès par le groupe de Halestrap, il est important de signaler que nous n'avons pas été en mesure d'obtenir de résultats de fonction cardiaque satisfaisants avec cette méthode de perfusion et avons dû procéder aux modifications qui sont décrites dans ce mémoire. Les travaux de mise au point effectués nous ont permis de modifier cette



approche et d'éliminer les effets non désirables sur la fonction cardiaque sans compromettre la mesure de la séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG.

### 3.1.2.2 Calcul de l'index d'ouverture du PTP

Pour obtenir une mesure de l'ouverture du PTP la plus précise possible, le calcul de séquestration mitochondriale de [<sup>3</sup>H]-DOG doit tenir compte de plusieurs facteurs qui peuvent introduire des artefacts.

Le premier facteur est la variation interindividuelle de la quantité de [<sup>3</sup>H]-DOG-6P cytosolique accumulée dans le cœur au moment de l'ouverture du PTP. Cette quantité peut varier en raison de différences au niveau de la vitesse de transport par les GLUT durant la période de chargement. Lorsque des protocoles d'ischémie-réperfusion sont utilisés, des variations au niveau de l'intégrité du sarcolemme peuvent également causer une libération plus ou moins grande de [<sup>3</sup>H]-DOG-6P dans le perfusé coronarien. Globalement ces phénomènes affectent directement la quantité de [<sup>3</sup>H]-DOG-6P retrouvée dans la fraction mitochondriale et ce de manière indépendante du nombre de pores qui s'ouvrent.

Le second facteur qui influence directement la quantité de [<sup>3</sup>H]-DOG retrouvée dans la fraction mitochondriale est la quantité de mitochondries récupérée au cours de l'isolation qui peut varier d'un jour à l'autre et en fonction de la sévérité du dommage induit par l'I-R.

De manière à tenir compte de ces deux facteurs, le calcul de l'index de séquestration du [<sup>3</sup>H]-DOG (ou index DOG) est donc calculé comme suit :

$$\text{index DOG} = 10^5 \times \frac{[\text{H}]-\text{DOG-6P mito par unité de CS}}{[\text{H}]-\text{DOG-6P tissulaire par g de cœur}}$$

Dans ce calcul, le [ $^3\text{H}$ ]-DOG-6P mitochondrial est exprimé en d.p.m. par unité de l'enzyme citrate synthase. Ceci permet de normaliser les valeurs de radioactivité par unité de mitochondrie récupérée. D'autre part, la radioactivité mitochondriale est exprimée par rapport au compte de radioactivité par gramme de tissu cardiaque mesuré dans l'homogénat total. Ceci permet de tenir en compte toute variation au niveau du contenu tissulaire en [ $^3\text{H}$ ]-DOG-6P.

Par ailleurs, une des limites de cette technique est que l'incorporation mitochondriale de [ $^3\text{H}$ ]-DOG-6P n'est mesurée que sur les mitochondries qui ont conservé une intégrité suffisante pour survivre à l'isolation [81, 100]. La méthode ne permet donc pas de rendre compte directement de l'ouverture du PTP dans les mitochondries qui ont été perdues au cours de l'isolation. De manière à considérer ce phénomène, il a donc été suggéré de normaliser l'index DOG par la quantité totale de CS récupérée dans la fraction mitochondriale par g de cœur [81, 100].

### **3.2 Utilisation de la technique du [ $^3\text{H}$ ]-DOG pour l'étude de la cardio-protection.**

La technique de séquestration mitochondriale du [ $^3\text{H}$ ]-DOG a été utilisée pour investiguer l'effet de plusieurs traitements pharmacologiques ainsi que du préconditionnement ischémique sur l'ouverture du PTP en réperfusion. La section qui suit présente un aperçu des principaux résultats obtenus.

#### **3.2.1 Cyclosporine A et Sanghlifehrin A**

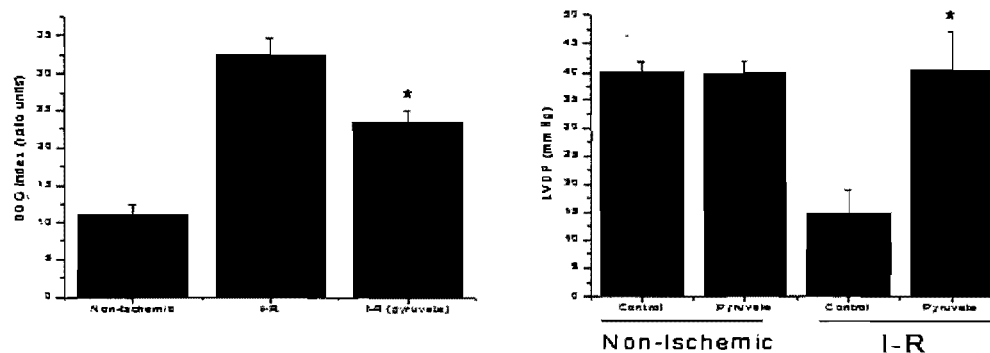
L'effet de la CsA et de la SfA, deux inhibiteurs directs du PTP, sur des cœurs isolés perfusés soumis à l'I-R a été investigué dans deux études [75, 100]. Javodov et al. [100] ont montré que l'administration de CsA durant l'ischémie et tôt en réperfusion était associée à une réduction de 30% de l'index DOG. Comme les auteurs en ont fait mention [81, 100], ce modeste effet de la CsA sur l'index DOG est

surprenant compte tenu du puissant effet inhibiteur de la CsA sur le PTP observé *in vitro* sur mitochondries isolées. Cependant, comme il a été mentionné précédemment, une des limites de l'index DOG est qu'il ne permet pas de rendre compte de l'ouverture du PTP survenu dans les mitochondries qui ont été perdues lors de la procédure d'isolation due à des dommages excessifs subis durant l'I-R. Ceci résulte donc en une sous-estimation de la quantité réelle de mitochondries dans lesquelles la transition de perméabilité a eu lieu. Parce que la CsA atténue de façon significative cette perte de mitochondries observée en réponse à l'I-R (tel que mesuré par le recouvrement de citrate synthase), cette sous-estimation est moindre en présence de l'inhibiteur. Ce phénomène permet d'expliquer au moins en partie l'effet apparemment modeste de la CsA sur l'ouverture du PTP *in situ*. Lorsque cette différence est tenue en compte en normalisant l'index DOG par unité de CS recouverte, l'effet inhibiteur de la CsA sur l'ouverture du PTP est plus compatible avec les données obtenues *in vitro*. Javadov et al. [100] ont également observé une réponse similaire avec la sangliféhrin A qui exerce son effet inhibiteur sur le PTP par un mécanisme similaire à celui de la CsA [100]. Pour clore cette section, il n'est pas surprenant d'observer que ni la CsA, ni la SfA n'abolissent complètement l'ouverture du PTP en réponse à l'I-R. En effet, il n'existe aucun inhibiteur irréversible de l'ouverture du PTP. En général, la plupart des agents connus ne font donc que retarder l'ouverture du PTP par désensibilisation partielle au  $Ca^{2+}$  ou à d'autres inducteurs physiologiques tel le stress oxydant.

### 3.2.2 Pyruvate et Propofol

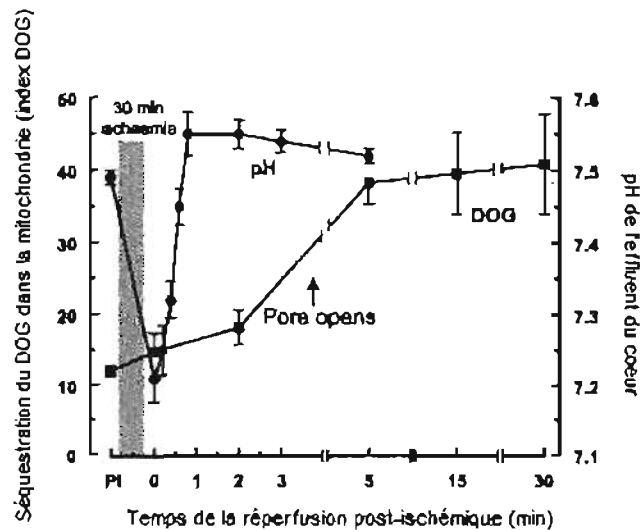
Plusieurs études ont démontré le potentiel cardio-protecteur du pyruvate contre l'ischémie-réperfusion [27, 30, 53]. Dans le but de déterminer si cet effet bénéfique était relié à une inhibition de l'ouverture du PTP, Kerr et al. [105] ont soumis des cœurs à une ischémie-réperfusion en présence ou en absence de pyruvate

à une concentration de 10 mM. Ces auteurs ont démontré que la présence de pyruvate durant l'ischémie et la réperfusion permettait de réduire de 28% l'index DOG, de retarder l'occurrence de contracture ischémique et d'améliorer la récupération de la fonction contractile en réperfusion (Figure 17).



**Figure 17: Effets de la présence de pyruvate sur la fonction contractile et l'ouverture du PTP lors d'une I-R.** La figure présente l'index DOG et la pression ventriculaire développée (LVDP) dans des cœurs non ischémiques, et des cœurs soumis à une période d'ischémie-réperfusion (30-40 minutes) en présence ou en absence de 10 mM pyruvate. \* : Significativement différent du groupe contrôle non traité au pyruvate (\*P<0,05). Adapté de (Kerr et al. 1999).

Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer l'effet inhibiteur du pyruvate sur l'ouverture du pore. La première hypothèse est que le pyruvate permettait de retarder le retour à un pH normal en réperfusion. Cette hypothèse privilégiée par le groupe de Halestrap est basée sur l'observation qu'*in vitro* sur mitochondries non énergisées, la diminution du pH désensibilise le PTP à l'ouverture induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  (voir section 2.3.2.1) et que l'ouverture du PTP en réperfusion coïncide temporellement avec le retour à un pH normal (Figure 18).



**Figure 18: Relation temporelle entre l'ouverture du PTP et le pH de l'effluent coronarien au cours de la réperfusion.** L'ouverture du PTP a été évaluée par la technique de séquestration du  $[^3\text{H}]$ -DOG à différents temps de réperfusion à la suite d'une ischémie globale de 30 minutes. Le pH a été mesuré à intervalle régulier dans le perfusé coronarien. Les valeurs de pH et de séquestration du  $[^3\text{H}]$ -DOG sont tirées des études de Kerr et al 1999 et Javadov et al 2003 respectivement.

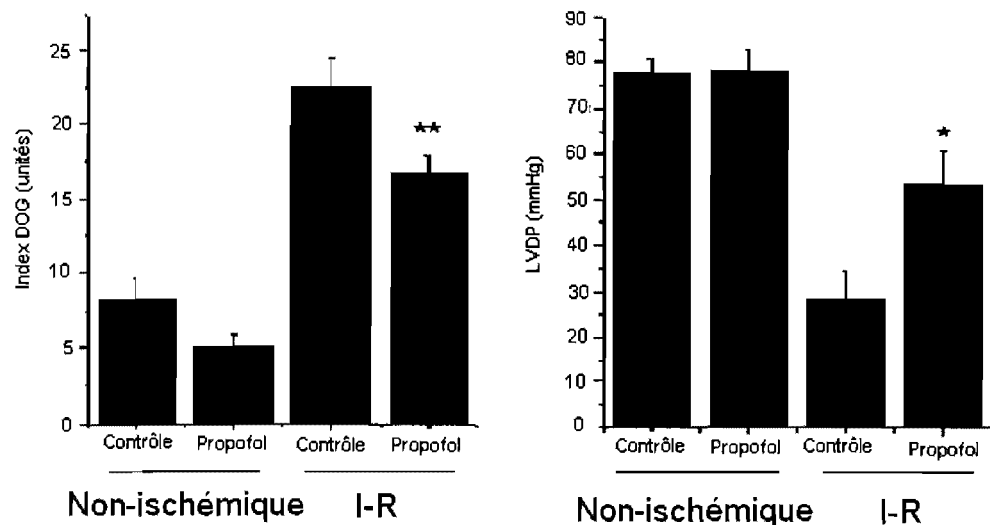
Cependant, il est important de mentionner qu'une étude récente a clairement démontré qu'en condition énergisée et en présence d'une concentration élevée de phosphate inorganique (comme c'est le cas en réperfusion), un pH acide favorisait l'ouverture du PTP [110]. Cette hypothèse demande donc à être confirmée.

La seconde hypothèse pour expliquer l'effet du pyruvate fait appel à sa propriété anti-oxydante [19, 53]. En effet, le pyruvate en s'oxydant a la capacité d'éliminer les radicaux libres formés durant la réperfusion, ce qui pourrait permettre d'atténuer l'ouverture du PTP.

Finalement, la troisième hypothèse fait appel aux qualités de substrat énergétique du pyruvate. Son oxydation par les mitochondries pourrait en effet permettre un rétablissement plus rapide du potentiel de membrane et donc de s'éloigner du voltage seuil en deçà duquel le PTP s'ouvre (voir section 2.3.2.1). Cependant, il est encore une fois important de nuancer cette hypothèse en mentionnant que la récupération rapide du potentiel de membrane en réperfusion

peut également avoir comme effet négatif de favoriser une prise rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé dans la cellule cardiaque, ce qui en soit peut déclencher l'ouverture du PTP. Il semble donc que l'occurrence d'ouverture du pore en réperfusion soit dictée par un équilibre complexe entre des facteurs activateurs et inhibiteurs.

Tout comme le pyruvate, le propofol (DIPRIVAN®, Zeneca Pharma), un agent anesthésiant qui est bien connu pour ses propriétés anti-oxydantes [64, 131] exerce un effet cardio-protecteur qui peut s'expliquer du moins en partie par une inhibition du PTP [101]. En effet, il a été démontré que le propofol administré durant l'I-R permettait de diminuer de 26 % l'index DOG et d'améliorer sensiblement la récupération de la fonction contractile en réperfusion. Lorsque testé sur mitochondries isolées, le propofol exerçait également un effet inhibiteur sur l'ouverture du PTP induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  suggérant que le mécanisme d'action du propofol était direct plutôt que médié par un changement bénéfique au niveau de l'environnement intracellulaire.



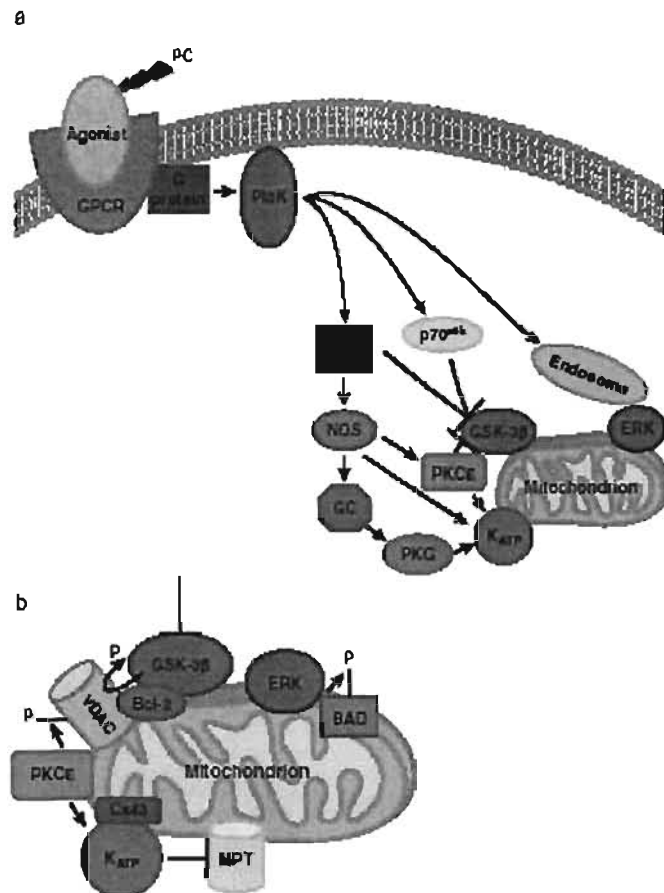
**Figure 19: Effets du traitement au propofol sur la fonction contractile et l'ouverture du PTP lors d'une ischémie-réperfusion.** La figure présente l'index DOG et la pression ventriculaire développée (LVDP) dans des cœurs non ischémiques, et des cœurs soumis à une période d'ischémie-réperfusion (30-40 minutes) en présence ou en absence de Propofol. \* : Significativement différent du groupe contrôle non traité au pyruvate (\* $P < 0,025$ ). Adapté de (Javadov et al. 2000).

Dans l'ensemble, les études portant sur le pyruvate et le propofol suggèrent clairement qu'une variété d'agents pharmacologiques qui ne sont pas des inhibiteurs indirects du PTP, incluant des anti-oxydants et des modulateurs métaboliques, pourraient en partie exercer leurs effets protecteurs en affectant de manière bénéfique un ou plusieurs modulateurs de l'ouverture du PTP.

### **3.2.3 Préconditionnement ischémique et exercice physique**

Des études récentes démontrent qu'outre la modulation pharmacologique, des stimuli physiologiques connus pour leur potentiel cardio-protecteur causent une inhibition de l'ouverture du PTP en réponse à l'ischémie-réperfusion. C'est notamment le cas du preconditionnement ischémique (PCI) [100] et de l'exercice physique [35].

Le preconditionnement ischémique induit par deux à trois cycles courts d'ischémie (5 min) intercalé aux cinq minutes induit un puissant effet protecteur contre les dommages causés par une ischémie prolongée [132]. Bien que ce phénomène ne soit pas encore bien compris, il semblerait déclenché par la relâche de plusieurs substances en réponse aux cycles courts d'ischémie-réperfusion telles la norépinéphrine, la bradikinine, l'adénosine ainsi que des opioïdes. Il a été démontré que ces substances activent une voie de signalisation intracellulaire protectrice dans laquelle les mitochondries jouent un rôle prépondérant. Bien que les mécanismes ne soient pas complètement élucidés, l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  mitochondriaux et l'inhibition du PTP seraient impliqués (Figure 20).



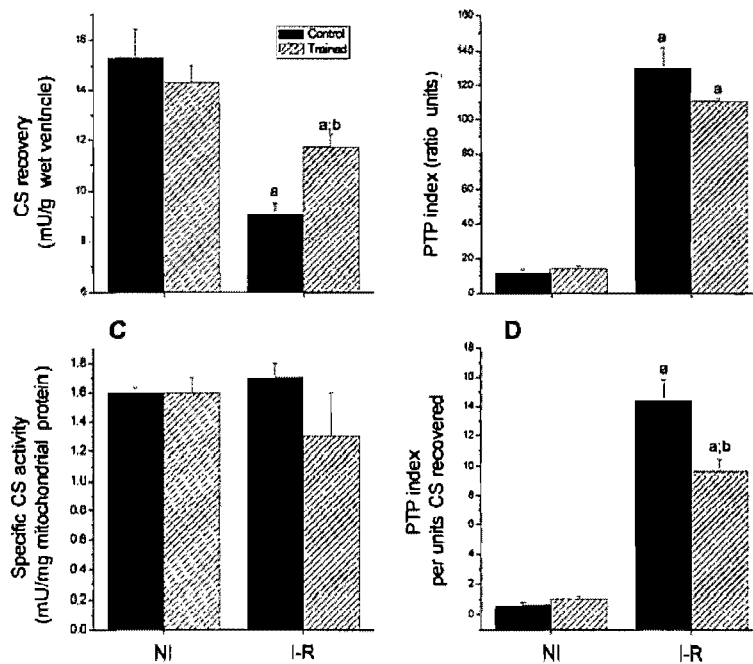
**Figure 20: Voies de signalisation activées par le preconditionnement (PC).** (a) Le PC entraîne la relâche d'adénosine, de bradykinine et d'opioïdes qui se lie à un récepteur couplé à une protéine G (GPCRs) et activent une cascade signalétique induisant une cardioprotection. L'activation de PI3-kinase (PI3-K) entraîne une modification de l'activité d'un bon nombre de molécules signalétiques incluant AKT ( aussi connue sous le nom de PKB), la protéine kinase c (PKC), la glycogène synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), l'oxyde nitrique synthase (NOS), la kinase régulée par des signaux extracellulaires (ERK), la protéine kinase G (PKG), la guanylate cyclase (GC), la kinase S6 ribosomale (p70<sup>S6k</sup>) et les canaux K<sub>ATP</sub> mitochondriaux. (b) Ces signaux convergent à la mitochondrie. PKC $\epsilon$  et GSK-3 $\beta$  ont la capacité de phosphoryler VDAC, qui pourrait contribuer à la régulation de la perméabilité membranaire. Adapté de (Murphy et Steenbergen 2006).

Le rôle du PTP dans le preconditionnement ischémique a été clairement démontré dans plusieurs études notamment celle de Javadov et al. [100] dans laquelle la technique de séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG a été utilisée. Cette étude a en effet démontré que le PCI était associé à une diminution de 52% de l'index DOG ainsi qu'à une meilleure récupération fonctionnelle à la suite d'une I-R. Des résultats similaires ont également été rapportés par d'autres groupes à l'aide de



méthodologies différentes autant sur des cœurs perfusés [6], que sur des cardiomyocytes [85] et des mitochondries isolées [6].

Dans le même ordre d'idée, l'exercice physique, une autre forme de conditionnement physiologique connue pour son potentiel cardio-protecteur, semble avoir la capacité d'inhiber l'ouverture du PTP en réponse à l'I-R. En effet, notre laboratoire a récemment démontré que cinq jours consécutifs d'exercice sur tapis roulant (60 min/jour, 30 m/min, 0% de pente) chez le Rat permettait d'atténuer la perte de mitochondries induite par l'I-R et de réduire de 33% l'index DOG normalisé pour le recouvrement mitochondrial.



**Figure 21: Effets d'une ischémie-réperfusion et de l'entraînement physique à court terme sur le rendement de l'isolation des mitochondries et sur la séquestration du  $[^3\text{H}]\text{DOG}$ .** Cette figure montre le recouvrement de la citrate synthase (CS) dans la fraction mitochondriale exprimée par gramme de ventricule (A) et par gramme de protéine mitochondriale (B) dans les cœurs normoxiques (NI :  $n = 4$  dans chacun des groupes expérimentaux) ou ayant subi une I-R ( $n = 11$  et  $9$  dans le groupe contrôle et entraîné). Le graphique C montre l'index de séquestration du DOG exprimé comme le ratio d.p.m. mitochondrial / d.p.m. tissulaire dans les mêmes cœurs. Le graphique D montre l'index de séquestration du DOG normalisé en fonction du recouvrement de la CS dans la fraction mitochondriale par gramme de ventricule. a : Significativement différents des cœurs non ischémiques dans le même groupe expérimental; b : Significativement différent du groupe contrôle dans la même condition de perfusion ( $p < 0,05$ ). Adapté de (Ciminelli et al 2006).

Dans l'ensemble, ces données démontrent que des stimuli physiologiques ont un impact important sur la probabilité d'ouverture du PTP ce qui peut conférer un phénotype cardio-protecteur. À l'opposé, il est donc logique de supposer qu'une condition pathologique comme le remodelage ventriculaire hypertrophique menant à l'insuffisance cardiaque puisse mener à une plus grande occurrence d'ouverture du PTP. Cette hypothèse, qui demeure à ce jour largement inexplorée, pourrait être un des mécanismes par lequel les mitochondries contribuent à la pathogenèse de l'insuffisance cardiaque. La section qui suit est donc consacrée à une revue de littérature sur les dysfonctions mitochondriales qui surviennent au cours de l'hypertrophie cardiaque pathologique et aux hypothèses courantes quant au rôle de ces organelles dans le développement de l'insuffisance cardiaque.

## **4 RÔLE DES MITOCHONDRIES DANS LE REMODELLAGE HYPERTROPHIQUE DU CŒUR ET L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

### **4.1 Introduction**

Le remodelage ventriculaire hypertrophique est une réponse du cœur à une variété de stress incluant la surcharge de travail chronique ou la perte de masse cardiaque suite à un infarctus ou une activation neuroendocrine [16]. Cette réponse est accompagnée par de multiples changements au niveau des cardiomyocytes et de la matrice extracellulaire [16, 67, 104]. Certains de ces changements, sinon la majorité, apparaissent délétères à long terme puisqu'ils sont associés à une augmentation de la mortalité et de la morbidité [15, 112] et une progression vers l'insuffisance cardiaque [16].

Comme dans tous les pays occidentaux, au Canada l'impact socio-économique de l'insuffisance cardiaque est en croissance. Ceci est relié d'une part au fait que la population canadienne est vieillissante et que cette pathologie affecte de

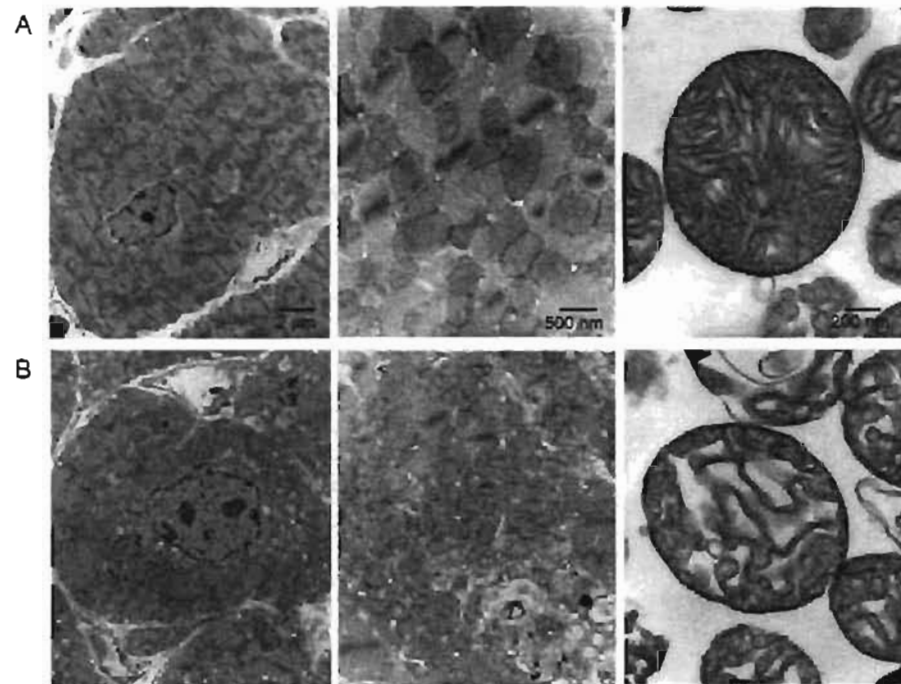
manière prépondérante les personnes âgées. D'autre part, l'amélioration des traitements pour l'hypertension chronique et les maladies coronaires ont permis d'augmenter le taux de survie relié à ces pathologies augmentant ainsi la prévalence de complications tardives telles l'insuffisance cardiaque. Au Canada, les maladies cardiovasculaires, dont l'insuffisance cardiaque est une des principales affections, sont une cause majeure d'hospitalisation. En effet, selon les statistiques de 1993, celles-ci ont coûté 19,8 milliards de dollars aux contribuables Canadiens [83]. L'insuffisance cardiaque atteint plus de 400 000 Canadiens et 50 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année [109]. De même, aux États Unis, plus de 5 millions d'individus souffrent d'insuffisance cardiaque chronique et l'incidence de cette maladie est en hausse [1].

Malgré l'association bien documentée entre l'hypertrophie cardiaque et le développement de l'insuffisance cardiaque, les raisons pour lesquelles certains cœurs hypertrophiés progressent vers la décompensation alors que d'autres ne progressent pas vers cet état de défaillance systolique sont encore mal connues [16, 104]. Parmi les facteurs potentiellement 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 et de radicaux libres [71, 166]. Tel que discuté dans cette section, un certain nombre d'études ont rapporté des dysfonctions à ce niveau ainsi qu'au niveau de la structure mitochondriale dans les cœurs insuffisants [114, 120, 139, 154, 159]. Par ailleurs, tel que décrit dans la section précédente, il est maintenant bien accepté que les mitochondries jouent un rôle capital dans la survie ou la mort cellulaire par leur capacité à séquestrer ou relâcher un ensemble de facteurs pro-apoptotiques en réponse à des signaux spécifiques ou à des dommages mitochondriaux. Plusieurs études ont également rapporté une plus grande relâche de ces facteurs et une activation des voies effectrices de la mort

cellulaire dans le cœur hypertrophié [102]. Ces indices sont également présentés et discutés.

#### 4.2 Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries dans le cœur insuffisant.

Plusieurs études menées sur des tissus humains ainsi qu'avec des modèles expérimentaux divers chez l'animal ont démontré la présence d'une variété d'anomalies mitochondriales dans le cœur insuffisant [114, 120, 154, 159]. Au plan structural, les anomalies sont présentes au niveau des membranes interne et externe, et l'occurrence de mitochondries affichant une réduction de la densité des cristae ou un gonflement de la matrice est augmentée [139, 145].



**Figures 22: Morphologie des cardiomyocytes et des mitochondries dans un modèle d'insuffisance cardiaque induite par le TNF $\alpha$ .** Ces micrographies électroniques démontrent que la surexpression de la cytokine TNF $\alpha$  (qui est impliquée dans le développement de l'insuffisance cardiaque) dans le cœur de souris induit de profondes altérations morphologiques des mitochondries dans le cœur (images de gauche et du centre) ou les mitochondries isolées (images de droite). (A) souris contrôles, (B) souris transgéniques TNF $\alpha$ . Adapté de Ozcan et al 2003.

Outre ces changements structuraux, bon nombre d'études effectuées chez l'Homme et l'animal rapportent également une diminution de l'activité de plusieurs

enzymes mitochondriaux mesurée sur le tissu cardiaque entier et sur des préparations de mitochondries isolées [26, 97-99, 129, 151]. Des résultats particulièrement clairs à ce sujet ont été rapportés par Jarretta et al. [98] chez des patients insuffisants atteints de cardiopathies dilatées et ischémiques (Tableau II). De manière similaire, une étude de Buchwald [26], également effectuée chez des patients atteints d'une cardiopathie dilatée a rapporté une diminution significative de l'activité du complexe III ( $3,77 \pm 0,82$  vs  $4,95 \pm 1,15 \mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) et du complexe IV ( $2,63 \pm 0,96$  vs  $3,65 \pm 0,6 \mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) de la chaîne respiratoire sur mitochondries isolées.

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

<sup>a</sup> Activity values expressed as nmol/min/mg prot.

<sup>b</sup> ANOVA test for the three groups taken together.

<sup>c</sup> These values were significantly lower than control values in the Student–Newman–Kreuls post-hoc test.

**Tableau II: Activité des complexes de la chaîne respiratoire chez des patients humains atteints de cardiopathies dilatées ou ischémiques.** Le tableau présente l'activité de complexes I, II, III et I+III mesurés dans l'homogénat total obtenu à partir de biopsies effectuées au moment de chirurgie de transplantation cardiaque sur le cœur de patients insuffisants atteints de cardiopathies dilatées (IDC) ou ischémiques (IC). Les valeurs contrôles ont été déterminés sur les mitochondries à partir des cœurs transplantés. Adapté de (Jarretta et al 2000).

Dans le cœur insuffisant, ces changements enzymologiques apparaissent inévitablement reliés à une diminution de la capacité respiratoire des mitochondries, et ceci en présence d'une variété de substrat énergétique alimentant la chaîne respiratoire à différents niveaux [96, 99, 139, 154, 157] (Tableau III).

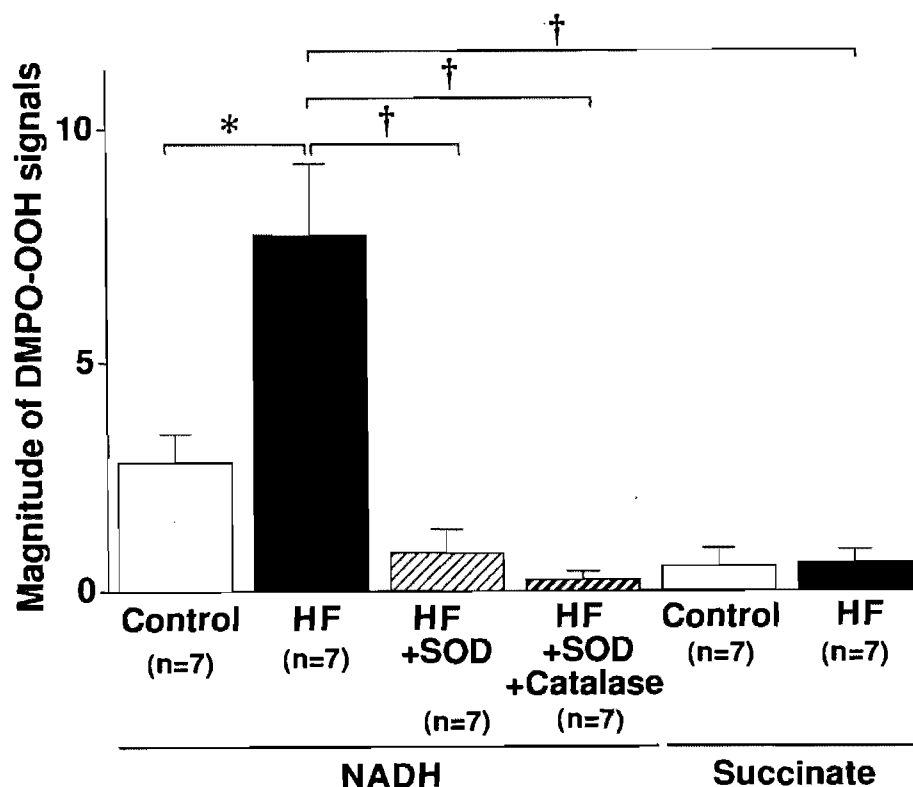
**Tableau III: Respiration de mitochondries isolées de coeurs contrôles (SHAM) ou 18 sem post-ligature de l'artère coronaire (CAL)**

Paramètre	Sham	CAL
<i>N</i>	9	9
<i>Citrate synthase (unités/mg protéine)</i>	2,63 ± 0,12	1,97 ± 0,03 **
<i>Respiration (nmol O par min/mg de protéine)</i>		
<b>Stade 2</b>		
2-Oxoglutarate	27 ± 1	25 ± 1
Succinate	69 ± 1	61 ± 1 **
Glutamate	29 ± 2	29 ± 1
<b>Stade 3</b>		
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 *
<b>Stade 3/stade 2 (RCI)</b>		
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 **
<b>Stade 3/ascorbate</b>		
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 **

Les résultats représentent la moyenne ± S.E.M. de 9 expériences par groupe. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  groupe CAL vs. groupe sham. Adapté de (Javadov et al 2005).

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté que la production de radicaux libres (ROS) était augmentée dans les mitochondries de coeurs insuffisants [78, 96, 97, 106]. La figure 23 tirée d'une étude de Ide et al. [97] dans laquelle la résonance

paramagnétique électronique (ESR) de la sonde hydroxy-TEMPO a été utilisée pour mesurer la production de ROS démontre bien ce phénomène. Ces auteurs ont observé une augmentation importante du signal TEMPO sur des particules mitochondriales isolées à partir de cœurs insuffisants en présence de NADH, témoignant d'une plus grande production de ROS comparativement aux mitochondries provenant de cœurs contrôlés [97]. Ce phénomène était également accompagné d'une plus grande quantité de peroxydes lipidiques [97], d'une présence accrue de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial [96] et de déficits au niveau de l'activité des complexes I, III et IV [96] dans les cœurs insuffisants comparativement aux cœurs normaux. D'autres études ont confirmé l'augmentation de la fréquence de mutations de l'ADN mitochondrial dans le cœur insuffisant [96, 115, 121, 122]. Ce phénomène a été attribué à la production accrue de ROS par la mitochondrie et au fait que cette organelle possède un système de protection et de réparation de l'ADN qui est limité. Ce constat a mené à la suggestion que les mutations de l'ADN mitochondrial pourraient expliquer l'apparition de certaines des anomalies respiratoires décrites précédemment [122]. Bien que ceci soit possible, il a néanmoins été démontré que la présence de mutations de l'ADN mitochondrial n'était pas obligatoire pour observer des déficits dans la production d'ATP mitochondriale [151]. Étant donné qu'une grande majorité des protéines mitochondriales sont encodées dans le génome nucléaire, cette observation semble concevable.



**Figure 23 : Production de radicaux libres par des particules mitochondriales isolées à partir de cœurs normaux et insuffisants.** Les résultats présentent la production de ROS mesurée par résonance paramagnétique électronique du TEMPO sur des particules mitochondriales provenant de cœurs normaux (Control) et de cœurs en insuffisance (HF) suite à un remodelage post-infarctus chez le chien. Les substrats utilisés pour alimenter les complexes respiratoires étaient le NADH (complexe I) et le succinate (complexe II). Le signal TEMPO relié à la production de ROS était significativement inhibé dans les deux groupes expérimentaux en présence de SOD (100 U/mL) ou SOD (100 U/mL) avec catalase (500 U/mL) témoignant de la spécificité du signal TEMPO. La différence entre contrôle et HF est uniquement observée en présence de NADH suggérant qu'un défaut au niveau du complexe I est responsable. 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 ( $p < 0,05$ ). Adapté de (Ide et al 1999).

Par ailleurs, au niveau des systèmes de défenses antioxydants il semble exister une réponse biphasique au cours du remodelage ventriculaire. En effet, quelques études ont rapporté dans le cœur en phase compensée d'hypertrophie une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes dont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathione peroxydase, et la catalase, ainsi qu'une augmentation du contenu en vitamine E et un rapport glutathione réduit / glutathione oxydé plus élevé [56, 89, 90]. Cependant, cette situation s'inverse rapidement pour faire place à



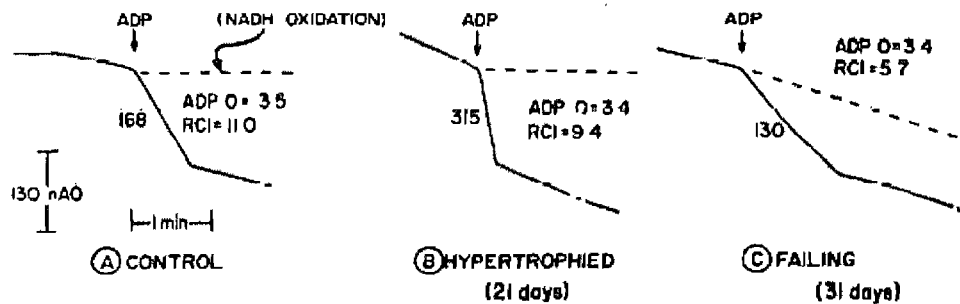
une diminution des capacités de défense [56, 89, 90]. Ces données ont mené à la suggestion que l'incapacité à contrer l'augmentation du stress oxydant associée au remodelage pathologique, dont une partie est certainement attribuable aux mitochondries, contribuerait à la décompensation cardiaque.

#### **4.3 Modifications structurales et fonctionnelles des mitochondries en phase d'hypertrophie compensée.**

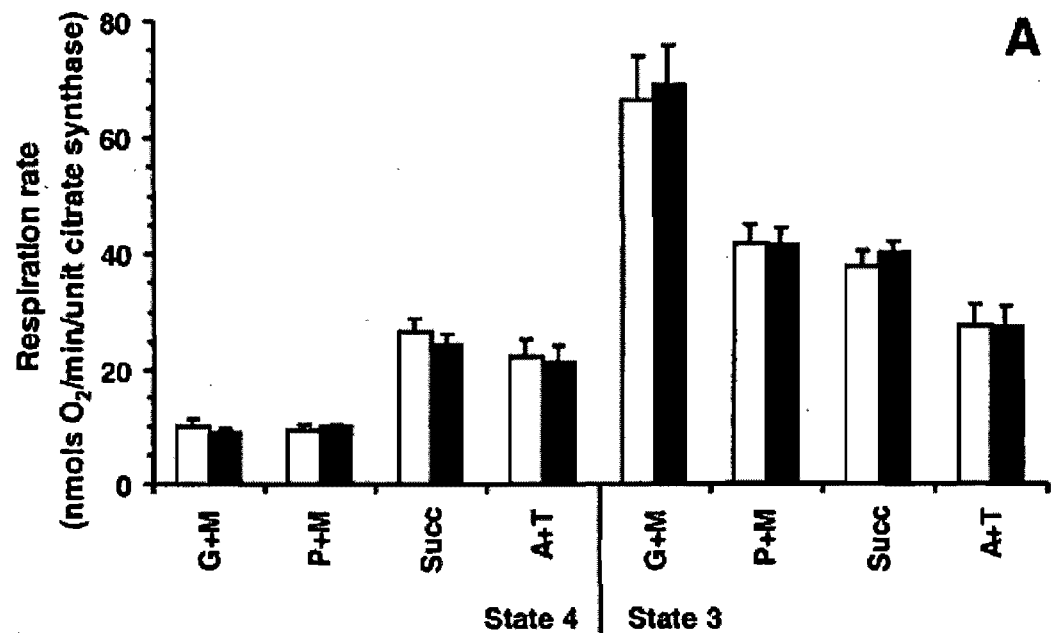
À l'opposé des résultats obtenus dans le cœur insuffisant, la majorité des études qui ont été effectuées à un stade moins avancé de remodelage cardiaque rapportent peu ou pas de dysfonctions mitochondriales. Aucun changement notable de la structure fine des mitochondries ne semble observable [162]. Par ailleurs, une diminution de la surface moyenne de mitochondries au profit d'une augmentation de leur nombre est observée [162]. Cependant, cette modification de l'organisation du réseau mitochondrial n'a pas de conséquence sur le volume des cellules cardiaques occupé par les mitochondries [162].

Au niveau de la fonction respiratoire, l'ensemble des études disponibles suggère une capacité respiratoire normale ou même augmentée dans le cœur hypertrophié [23, 51, 111, 116, 157, 160]. La figure 24 tirée d'une étude du groupe de Sordahl [157] dans laquelle un modèle de constriction de l'aorte chez le lapin a été utilisé démontre clairement ce phénomène. En effet, au stade compensé d'hypertrophie, les mitochondries affichaient une augmentation marquée de la respiration maximale stimulée par l'ADP comparativement aux mitochondries provenant des cœurs contrôles, alors que les mitochondries provenant de cœurs insuffisants affichaient une nette dysfonction. Par contre, « l'hyperfonction » respiratoire observée en phase compensée n'est pas systématiquement rapportée comme le montre la figure 24 provenant d'une étude de Brookes et al. [23]. Ces

auteurs n'ont rapporté aucune modification de la respiration basale et de la respiration stimulée par l'ADP huit semaines après une constriction de l'aorte abdominale chez le Rat, et ce, en présence de substrats pour le complexe I, II et IV.



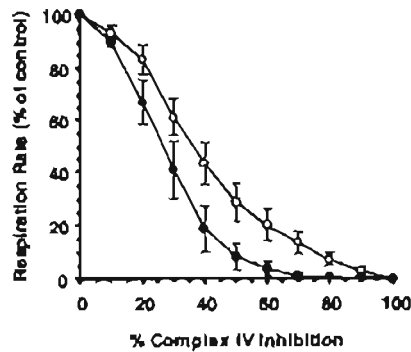
**Figure 24: Fonction respiratoire mesurée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs en phase d'hypertrophie compensée et d'insuffisance.** La figure présente des tracés de respiration typiques obtenus sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de lapins normaux (A) ou durant la phase d'hypertrophie compensée (B) ou d'insuffisance (C) induite par la constriction de l'aorte. Les mitochondries étaient énergisées avec un mélange de glutamate et de malate. À l'endroit indiqué, de l'ADP était ajouté pour induire la respiration maximale (stade 3) puis la respiration basale (stade 4) obtenue après phosphorylation complète de l'ADP était enregistrée. Les valeurs maximales obtenues en stade 3 sont indiquées à gauche des tracés (en nAO/min/mg protéine). Les rapports ADP : O et RCI (stade 3/stade 4) sont indiquées à droite comme témoins de l'efficacité du couplage entre la respiration et la phosphorylation. La ligne achurée indique la réponse de la respiration lorsque du NADH exogène était ajouté au lieu de l'ADP. Une augmentation de la respiration en présence de NADH témoigne d'une atteinte à l'intégrité de la membrane interne. Adapté de (Sordahl et al 1973).



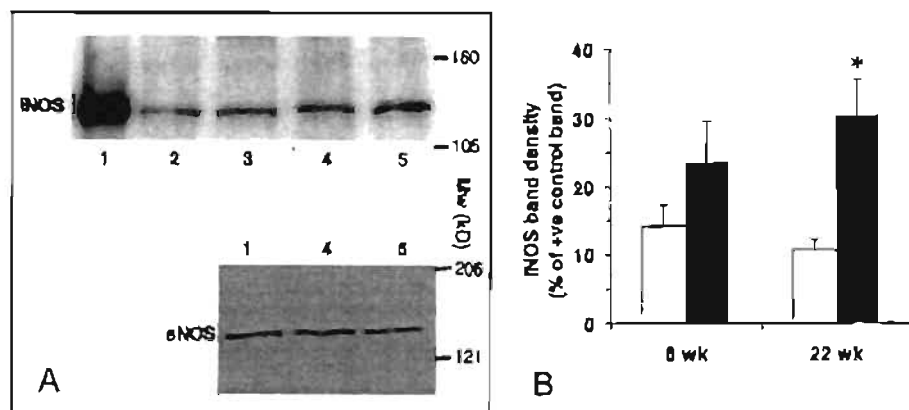
**Figure 25: Propriétés respiratoires de mitochondries isolées à partir de cœurs normaux ou en stade d'hypertrophie compensée à la suite d'une constriction de l'aorte abdominale.** La figure présente la vitesse de respiration évaluée sur des mitochondries isolées à partir de cœurs de rats normaux (□) ou au stade compensé d'hypertrophie secondaire à 8 semaines 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). Adapté de (Brookes et al 2001).

Par ailleurs, malgré l'absence de dysfonctions mitochondriales évidentes au stade compensé d'hypertrophie, il semble néanmoins exister des anomalies subtiles qui peuvent être mises en évidence lorsque les mitochondries sont soumises à des conditions particulières. Par exemple, Brookes et al. [23] ont démontré qu'en dépit de l'absence de modification de la respiration en condition standard d'incubation, les mitochondries provenant de cœurs hypertrophiés étaient significativement plus sensibles à l'oxide nitrique (NO<sup>•</sup>) (Figure 26), un facteur de régulation de la respiration exerçant un effet inhibiteur sur le complexe IV [37]. Cette observation est intéressante dans la mesure où l'expression de la NO<sup>•</sup> synthase (iNOS) est augmentée non seulement dans le cœur insuffisant [127, 164], mais également dans le cœur compensé [5, 164] (Figure 27), suggérant que la respiration mitochondriale

pourrait être affectée *in vivo* même au cours de la phase compensée d'hypertrophie. Cette étude souligne également l'intérêt de soumettre les mitochondries à des contraintes régulatrices ou des perturbations *in vitro* pour mettre en évidence des dysfonctions précoces.



**Figure 26: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur la respiration mitochondriale lors d'une inhibition du complexe IV avec  $\text{NO}^{\bullet}$ .** Les mitochondries ont été isolées à partir du ventricule gauche provenant de rats contrôles (o) et de rats soumis à 8 semaines de constriction de l'aorte abdominale (●). La respiration a été titrée avec des concentrations croissantes d'un donneur de  $\text{NO}^{\bullet}$ . Chaque point représente la moyenne  $\pm$  S.E.M. d'au moins 4 expériences différentes. Adapté de (Brookes et al 2001).



**Figure 27: Effet de l'hypertrophie cardiaque sur l'expression de la NO-synthase.** La figure présente les niveaux d'expression de la NOS inducible (iNOS : 130 KDa) et endothéliale (eNOS : 140 KDa) dans le cœur de Rats normaux ou soumis à une constriction de l'aorte abdominale (BAND). A : Dans les gels représentatifs, les puits contenaient respectivement : 1) les contrôles positifs (des lysats de macrophages de souris pour iNOS et de cellules endothéliales humaines pour eNOS), 2) contrôle 8 semaines, 3) BAND 8 semaines, 4) contrôle 22 semaines, 5) BAND 22 semaines. B) Analyse densitométrique des résultats obtenus pour l'expression de iNOS (barres blanches : contrôle, barres noires : BAND). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. d'au moins 4 expériences différentes. Adapté de (Brookes et al 2001).

Dans l'ensemble, l'analyse de la littérature disponible démontre donc que la majeure partie des dysfonctions mitochondriales ont été observées dans des cœurs ayant déjà atteint l'état d'insuffisance et qu'à l'état compensé de la pathologie, la morphologie et les fonctions basales des mitochondries semblent essentiellement normales [157]. Cette observation a d'ailleurs mené à la question légitime de savoir si les dysfonctions mitochondriales jouent un rôle causal dans la pathogenèse de l'insuffisance ou sont simplement une conséquence tardive. Par ailleurs, il est important de noter que la plupart des études disponibles ont évalué la respiration des mitochondries dans des conditions optimales bien définies qui ne reproduisent pas les contraintes ou les influences régulatrices rencontrées au niveau de l'organe entier. Les études de Brookes et al. [23] sur la réponse respiratoire au NO<sup>•</sup> démontrent clairement l'existence de réponses anormales à des régulateurs qui peuvent avoir des répercussions *in vivo*.

#### **4.4 Activation des mécanismes mitochondriaux de mort cellulaire dans le cœur insuffisant.**

Plusieurs études chez l'Homme et avec divers modèles expérimentaux chez l'animal ont rapporté la présence de plusieurs formes de mort cellulaire dans le myocarde insuffisant. L'examen histologique de tissu cardiaque humain révèle la présence de cellules nécrotiques, présumément à la suite d'ischémies focales ou d'un processus inflammatoire chronique [87, 108]. Plusieurs études ont également rapporté la présence accrue de plusieurs marqueurs de mort cellulaire apoptotique telle la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN génomique par marquage TUNEL [102, 129, 130, 135, 137]. Finalement, des études récentes démontrent également que l'autophagie est activée dans le cœur insuffisant, quoique le rôle de ce processus dans la mort cellulaire programmée ne soit pas encore bien défini [87, 108].

Bien que plusieurs mécanismes puissent entraîner cette mort cellulaire, certains indices expérimentaux suggèrent que les mitochondries jouent un rôle. En effet, une augmentation de la relâche de cytochrome c [135, 150] ainsi qu'une activation des caspases 9 [150] et 3 [130, 135] ont été rapportées dans des échantillons de tissu cardiaque provenant de patients humains ou d'animaux en insuffisance. Les mécanismes menant à la relâche de facteurs apoptotiques par les mitochondries sont encore relativement mal définis. Quelques études ont associé cette relâche à une augmentation de l'expression de Bax et une diminution de l'expression de Bcl-2 [130, 137, 149]. Ceci aurait pour effet possible la formation d'oligomères Bax/Bak dans la membrane mitochondriale externe et la relâche subséquente des facteurs pro-apoptotiques situés dans l'espace inter-membranaire. Par ailleurs, étant donné que Bax et Bcl-2 influencent également l'ouverture du PTP (voir section 2.3.2.1), il est possible que ce mécanisme de perméabilisation membranaire joue également un rôle.

À cet égard, une étude récente du groupe de Karmazyn [99] a démontré que l'occurrence d'ouverture du PTP était augmentée dans le cœur insuffisant. En effet, ces auteurs ont démontré que l'ouverture du PTP mesuré *in situ* par la technique du [<sup>3</sup>H]-DOG était augmentée après seize semaines de remodelage induit par infarctus. Ce phénomène a été observé dans des cœurs bien perfusés et oxygénés, suggérant que l'ouverture du PTP est un processus en cours à ce stade de la pathologie. Cette observation est compatible avec les données rapportées chez des souris transgéniques surexprimant de manière cardio-spécifique le TNF $\alpha$ , une cytokine impliquée dans l'insuffisance cardiaque [139]. En effet, la quantité de Ca<sup>2+</sup> requise pour induire l'ouverture du PTP *in vitro* sur mitochondries isolées était significativement diminuée chez ces souris comparativement aux souris contrôles. Il est par ailleurs

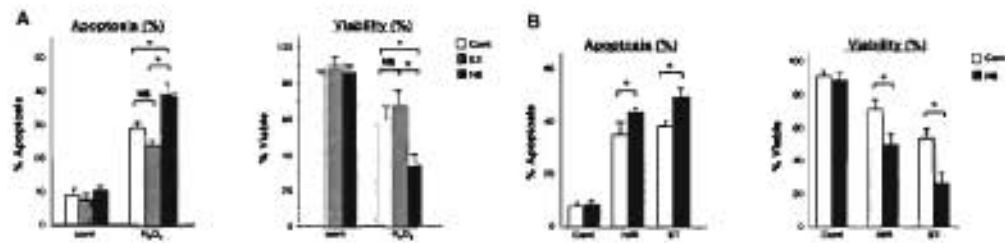
important de remarquer que dans ces deux études, les mitochondries affichaient également d'importantes dysfonctions respiratoires étant donné l'état avancé de la pathologie. Il est donc possible que l'ouverture du PTP observée soit une simple conséquence d'atteintes mitochondriales sévères et joue un rôle limité dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Fait notoire cependant, l'étude du groupe de Karmazyn [99] a également démontré que l'effet bénéfique de l'inhibition chronique de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  avec le EMD87580 sur le remodelage ventriculaire était associé à une inhibition de l'ouverture du PTP. Cependant, puisque l'inhibition des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est susceptible d'exercer d'autres effets bénéfiques, il n'est pas clair que l'inhibition du PTP soit le mécanisme responsable des bénéfices au niveau du remodelage.

Globalement, les données disponibles indiquent donc que l'atteinte de l'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une activation substantielle et soutenue de la mort cellulaire qui est au moins en partie causée par des dysfonctions mitochondriales, des processus de perméabilisation membranaire impliquant certaines protéines de la famille des Bcl-2 et le PTP. Cependant, puisque ces phénomènes ont pour la plupart été observés dans le cœur insuffisant, leur rôle causal dans le développement de la pathologie n'est pas encore clairement établi. L'identification de dysfonctions mitochondriales précoces lors de la phase compensée du remodelage contribuerait à répondre à cette question et éventuellement à cibler des actions visant à leur prévention.

#### 4.5 La vulnérabilité au stress : un contributeur potentiel à la transition vers l'insuffisance cardiaque.

Les dysfonctions systoliques, une fois présentes à la suite d'un événement ayant déclenché le remodelage ventriculaire, se détériorent fréquemment de manière progressive sur une période allant de plusieurs mois ou années avant de précipiter la décompensation cardiaque. De ce fait, pendant la période compensée du remodelage ventriculaire, les cardiomyocytes sont vraisemblablement soumis à des périodes prolongées de stress allant des hypoxies ou ischémies régionales transitoires, aux réponses inflammatoires en passant par le stress oxydant et les déséquilibres de l'homéostasie calcique. Un concept récemment mis de l'avant est que la progression de l'hypertrophie compensée vers l'insuffisance cardiaque soit en partie causée par une plus grande vulnérabilité des cardiomyocytes aux stress induisant la mort cellulaire [102]. Dans cette étude, les auteurs ont évalué la vulnérabilité des cardiomyocytes à une variété de stress *in vitro* chez des rats Dahl (une souche de rat affichant une hypertension chronique et un remodelage ventriculaire en réponse à une diète salée) durant la période compensée et décompensée de la pathologie. Ils ont démontré que durant la phase compensée, les cardiomyocytes hypertrophiés affichaient un plus grand pourcentage de mort cellulaire suite à une ischémie-réperfusion simulée, un stress oxydant induit par incubation en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou une exposition à la staurosporine (Figure 28).





**Figure 28: Effet du remodelage ventriculaire hypertrophique sur la vulnérabilité des cardiomyocytes au stress *in vitro*.** Cette figure présente le pourcentage de cellules apoptotiques et la viabilité cellulaire en absence ou présence de stress *in vitro* incluant l'incubation en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'ischémie-réperfusion simulée (6-18 heures respectivement) et un traitement avec la staurosporine. Les tests ont été effectués sur des myocytes obtenus à partir de cœurs normaux (Cont), hypertrophiés à la suite d'un entraînement (EX) ou hypertrophiés par surcharge pressive (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 hypertensive. Les cardiomyocytes provenant des cœurs en hypertrophie pathologique compensée (HS) sont plus vulnérables aux trois formes de stress imposés. Les valeurs représentent la moyenne ± S.E.M. ( $n = 6$  dans chaque condition). NS : non significatif; \* : significativement différent de contrôle ( $P < 0,05$ ). Adapté de (Kang et al. 2004).

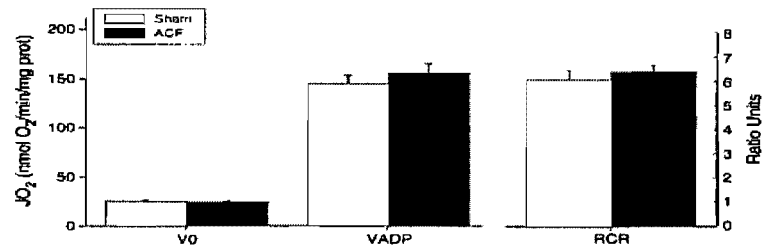
La plus grande vulnérabilité à l'ischémie-réperfusion en état d'hypertrophie compensée a également été rapportée dans plusieurs études menées sur le cœur entier perfusé *ex vivo* [3, 4, 68]. Fait notable, l'étude menée chez les rats Dahl par Izumo et al. [102] a également démontré que les indices histologiques témoignant d'une augmentation de la mort cellulaire *in vivo* au niveau de l'organe entier étaient observables dans le cœur insuffisant mais indécélables au cours du stade compensé, suggérant que la vulnérabilité au stress durant le stade compensé est un événement précoce qui pourrait jouer un rôle causal.

Étant donnée que la mort cellulaire induite par l'ischémie-réperfusion [50, 57, 81] comme le stress-oxydant [32, 55, 118, 136] est causée entre autres par l'ouverture du PTP, notre laboratoire a récemment émis l'hypothèse qu'au cours de la phase compensée d'hypertrophie, une augmentation de la vulnérabilité des mitochondries aux stress causant l'ouverture du PTP pourrait donc contribuer aux

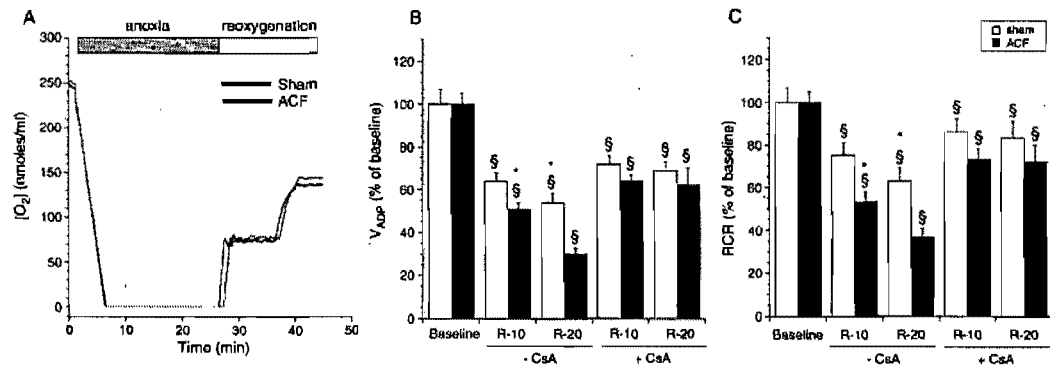
dysfonctions contractiles et à la mort cellulaire qui a été rapportée lorsque le cœur est soumis à un stress.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un modèle d'hypertrophie pathologique induite par une fistule aorto-cavale (ACF) chez le Rat WKHA. Cette souche de rat qui présente une masse cardiaque augmentée à la base et une susceptibilité au remodelage en réponse aux surcharges, a été utilisée dans le laboratoire de notre collègue le Dr. Christian Deschepper pour étudier les gènes reliés à l'hypertrophie cardiaque [158]. Des études antérieures provenant de ce laboratoire ont démontré que chez le rat WKHA, une hypertrophie compensée est systématiquement observable 12 semaines après induction de la surcharge volumique par ACF [158]. Nous avons donc isolé les mitochondries de rats contrôles et ACF à ce moment pour caractériser leur fonction basale et leur susceptibilité au stress *in vitro*.

Comme le démontre la figure 29, aucune différence entre le groupe contrôle et ACF n'a été observée au niveau de la respiration basale ( $V_0$ ) et stimulée par l'ADP ( $V_{ADP}$ ) en présence de substrats énergétiques alimentant le complexe I. De plus, le potentiel de membrane mesuré en condition basale était similaire chez les contrôles et les ACF. Par contre, la dysfonction respiratoire induite par une période d'anoxie-réoxygénation (A-R) était significativement plus importante dans les mitochondries ACF comparativement aux mitochondries contrôles (Figure 30). Fait notable, la présence de CsA durant la période d'A-R a permis d'abolir la différence entre les deux groupes expérimentaux, suggérant clairement que l'ouverture du PTP était responsable de l'augmentation de la dysfonction respiratoire chez les ACF.



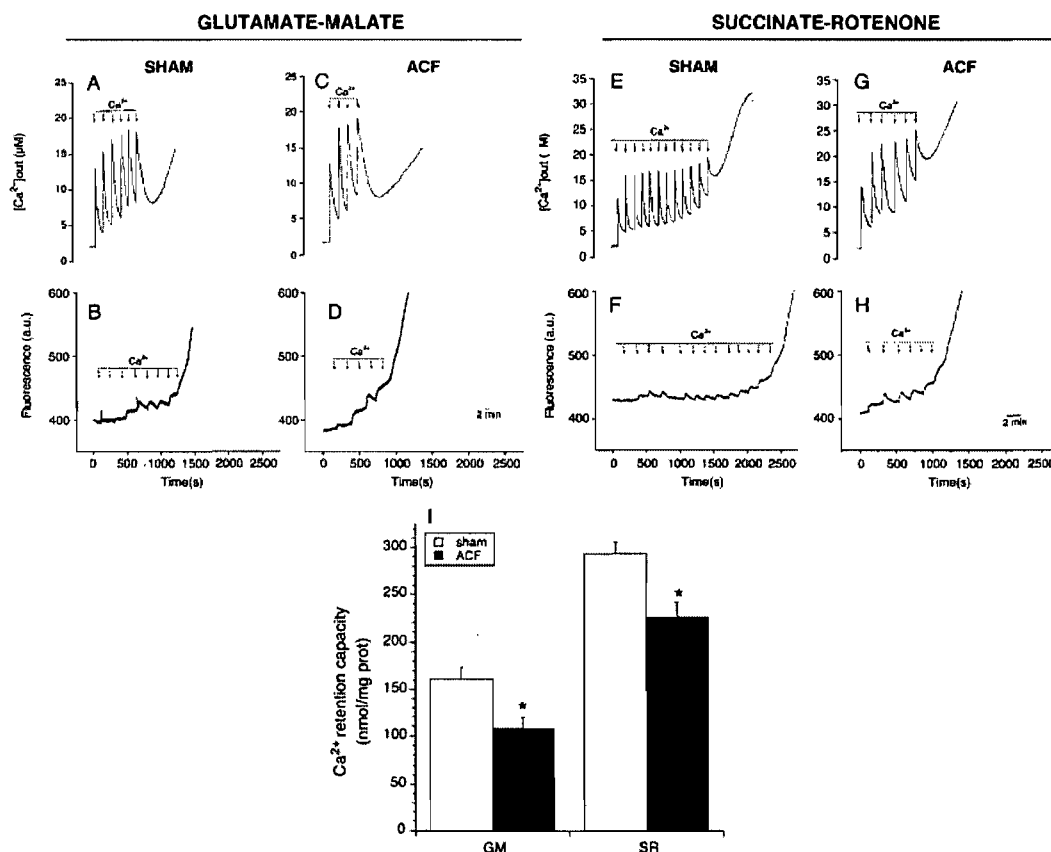
**Figure 29: Effet de la surcharge volumique sur la fonction basale de mitochondries cardiaques.** La figure présente la respiration basale en absence d'ADP ( $V_0$ ), la respiration maximale en présence de 1 mM ADP ( $V_{ADP}$ ) ainsi que le ratio RCR ( $V_{ADP}/V_0$ ) mesuré sur des mitochondries cardiaques isolées 12 semaines après une chirurgie sham ou une fistule aorto-cavale (ACF). Les mitochondries étaient énergisées avec un mélange glutamate-malate (5:2.5 mM). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$ S.E.M. pour un  $n = 12$  dans chaque groupe. Adapté de (Marcil et al 2006).



**Figure 30: 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  $O_2$  durant une anoxie-réoxygénation avec des mitochondries provenant d'animaux sham et ACF. Les valeurs obtenues pour  $V_{ADP}$  et le RCR à la 10<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> minute de réoxygénation (figures B et C) sont exprimées en pourcentage des valeurs observées en absence d'anoxie-reoxygénation (Baseline). Les expériences ont été répétées en absence ou présence de 1  $\mu$ M de cyclosporine A (CsA) ajouté avant l'anoxie. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. pour un  $n = 12$  dans chaque groupe.  $\S$ : significativement différent de pré-anoxie dans le même groupe expérimental, ( $p < 0,01$ ), \*: significativement différent du groupe sham dans les mêmes conditions expérimentales, ( $p < 0,01$ ). Adapté de (Marcil et al 2006).

De manière à confirmer la plus grande vulnérabilité des mitochondries ACF à l'ouverture du PTP, des tests de surcharge calcique ont été effectués compte tenu que le  $Ca^{2+}$  est l'inducteur obligatoire du PTP (Figure 31). Ce test consiste à soumettre les mitochondries à des ajouts successifs de  $Ca^{2+}$  et à déterminer la quantité de  $Ca^{2+}$  que peuvent accumuler les mitochondries avant le déclencher l'ouverture du PTP.

L'ouverture du PTP est caractérisée par la relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  accumulé (mesuré à l'aide de la sonde fluorescence Calcium-Green) et l'abolition du potentiel de membrane (mesuré en parallèle avec la sonde fluorescente Rhodamine 123). Ces expériences ont démontré que la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour induire l'ouverture du PTP était significativement inférieure dans les mitochondries ACF comparativement aux mitochondries contrôles peu importe le substrat respiratoire utilisé.



**Figure 31: 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  $\text{Ca}^{2+}$  (A, C, E et G) et du potentiel de membrane (B, D, F et H) obtenues sur les mitochondries sham et ACF énergisées soit avec du glutamate-malate (GM: 5:2.5 mM) soit du succinate (SR: 5 mM) en présence de 1  $\mu\text{M}$  de roténone. Les tracés montrent l'accumulation progressive de  $\text{Ca}^{2+}$  suivi par sa relâche et l'effondrement simultané du potentiel de membrane. Chaque flèche indique l'addition d'une dose de calcium de 42 nmol/mg protéine. La figure I présente la capacité de rétention calcique (CRC) calculée à partir de 8 à 10 expériences différentes dans chaque groupe. \*: Significativement différent des sham, ( $p < 0,05$ ). Adapté de (Marcil et al 2006).

Ces résultats indiquent donc qu'une susceptibilité au stress induisant l'ouverture du PTP se développe au cours de la phase compensée d'hypertrophie en absence de dysfonctions systoliques et à un moment où aucune anomalie respiratoire n'est décelable. Ce phénomène pourrait donc en théorie contribuer à la vulnérabilité cellulaire au stress et éventuellement à la progression vers la décompensation cardiaque. Cependant, cette vulnérabilité ayant été observée sur des mitochondries isolées soumises à des conditions expérimentales standardisées, il est possible qu'elle ne se manifeste pas lorsque l'organe entier est soumis au stress. L'objectif du travail effectué au cours de cette maîtrise était donc de valider une approche permettant de quantifier l'ouverture du PTP *in situ* sur le cœur perfusé de manière à répondre à cette question.

# **Chapitre 2- Méthodologie et résultats**

## **5 MÉTHODOLOGIE**

### **5.1 Animaux**

Toutes les expériences rapportées dans ce mémoire ont été approuvées par le Comité de Déontologie sur l'Expérimentation Animale (CDEA) de l'Université de Montréal. À moins d'indication contraire, les expériences menées à l'aide du modèle de surcharge volumique ont été effectuées sur des rats mâles WKHA provenant d'une colonie maintenue à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal (IRCM) par le Dr. Christian DesChepper. 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). Ces rats ont une pression artérielle normale, mais affichent une masse cardiaque augmentée et une plus grande susceptibilité au remodelage pathologique induit par surcharge, une caractéristique qui a été utilisée dans le laboratoire du Dr. DesChepper pour étudier les gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. Pour les expériences de perfusion cardiaque visant à mettre au point et optimiser la méthode de séquestration mitochondriale du [<sup>3</sup>H]-DOG, des rats mâles de souche Sprague-Dawley (SD) ont été utilisés. Tous les animaux étaient hébergés par paire dans une animalerie à environnement contrôlé (T : 20-23°C, Humidité : ≈25%) sous un cycle lumineux normal (12h/12h). Les animaux avaient un accès illimité à la nourriture (diète standard pour Rat) et à l'eau.

### **5.2 Surcharge volumique par fistule aorto-cavale**

Le modèle expérimental utilisé pour forcer un remodelage ventriculaire pathologique est celui de la surcharge volumique induite par une fistule aorto-cavale (ACF). Ce modèle a été sélectionné car il permet d'exposer le cœur à un stress soutenu pendant plusieurs semaines [7, 54, 92, 158], sans toutefois qu'il n'y ait de

signes de dysfonction systolique, ces derniers apparaissant à un stade plus tardif lorsque la limite de la réserve contractile a été atteinte [24]. De plus, la grande reproductibilité de ce modèle permet également d'étudier la vulnérabilité mitochondriale à des stades définis de la pathologie.

L'induction chirurgicale de l'ACF a été effectuée chez des rats âgés de dix semaines sous anesthésie à l'isoflurane. Les animaux ont été laparotomisés de manière à exposer l'aorte abdominale et la veine cave et un fil de soie a été placé sous l'aorte en amont du site choisi pour la fistule. Une aiguille de calibre 18G, a ensuite été insérée dans l'aorte de manière parallèle à l'orientation du vaisseau. Une fois l'aiguille insérée une déviation latérale a été effectuée pour percer la paroi latérale de l'aorte et de la veine cave créant ainsi la fistule. Après interruption momentanée de la circulation aortique à l'aide d'une traction légère sur le fil de soie, l'aiguille a été retirée puis un point de colle Vetbond appliqué sur le site pour assurer l'étanchéité de la fistule. L'apparition d'un flot sanguin de l'aorte vers la veine cave était vérifiée visuellement puis la paroi abdominale et la peau étaient suturées à l'aide de broches.

### **5.3 Paramètres morphologiques**

Après anesthésie avec un mélange de kétamine et xylazine (61,5 / 7,7 mg.kg<sup>-1</sup>), plusieurs paramètres morphologiques ont été déterminés chez des rats WKHA 12 semaines après la chirurgie : masse corporelle, masse du cœur, des ventricules droit et gauche, du foie et des poumons ainsi que la longueur du tibia afin d'apprécier l'importance du remodelage et la sévérité de l'atteinte.



#### 5.4 Perfusion de cœur en mode Langendorff

Après anesthésie avec un mélange de kétamine et xylazine (61,5 / 7,7 mg.kg<sup>-1</sup>), le cœur était rapidement excisé et plongé dans un tampon Krebs-Henseleit (tampon K-H en mM : 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub> et 11 glucose le tout bullé avec 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, pH 7,4, 37 °C). L'aorte était ensuite rapidement canulée puis perfusée en circuit ouvert avec un tampon K-H à une pression constante de 70 mm Hg. Une petite incision était pratiquée au niveau de l'artère pulmonaire de manière à favoriser le drainage des coronaires. Un ballonnet relié à un capteur de pression était ensuite inséré dans le ventricule gauche pour la mesure en continu des fonctions cardiaques à l'aide d'un système d'acquisition de données (Powerlab 8/30, ADInstruments, Colorado Springs, CO). Le débit coronaire ainsi que la relâche de LDH (un marqueur de dommage sarcolemmal des cardiomyocytes) dans le perfusat était mesurée à toutes les 10 minutes durant la perfusion. L'activité de la LDH a été mesurée par technique spectrophotométrique telle que décrite dans la section 2.9 et exprimée en mU/min/g tissu frais. Pour les expériences d'ischémie-réperfusion (I-R), le débit coronaire était fixé pendant 30 min à 3% du débit coronaire pré-ischémique par le biais d'une pompe péristaltique de précision. À la fin de la période d'ischémie, la perfusion normale à pression constante de 70 mm Hg était rétablie pendant 40 minutes. Immédiatement avant l'ischémie, une infusion continue de 100 µM d'épinéphrine dans la ligne de perfusion était amorcée et maintenue durant la période d'I-R de manière à augmenter le niveau de stress subi et mimer l'activation du système sympathique observé *in vivo*.

#### 5.5 Protocole original de perfusion avec le [<sup>3</sup>H]-DOG

Au cours de nos premières études [35], le protocole utilisé pour le chargement du cœur avec le [<sup>3</sup>H]-DOG était essentiellement celui qui a été décrit initialement par

le groupe de Halestrap [75] avec des modifications mineures. Après une période de stabilisation de 10 min, le cœur était perfusé pendant 30 min en circuit fermé avec 100 mL de tampon K-H contenant 0,5 mM de 2- $^3\text{H}$ -deoxyglucose (0,1  $\mu\text{Ci/mL}$ ). La perfusion en circuit ouvert avec le tampon K-H normal était ensuite rétablie pendant 5 minutes afin d'éliminer le  $^3\text{H}$ -DOG extracellulaire, puis le cœur était soumis à une période d'ischémie-réperfusion (I-R), ou immédiatement prélevé pour l'isolation des mitochondries, la mesure de l'index DOG et l'évaluation de la fonction mitochondriale. Nous avons observé que la perfusion en circuit fermé en présence de  $^3\text{H}$ -DOG menait à un déclin de la pression développée de l'ordre de 24 % sans atteinte de la fréquence cardiaque [35]. Cet effet sur la fonction ne semblait pas accompagné d'une perte d'intégrité des myocytes tel qu'apprécié par l'absence d'augmentation de la relâche de LDH dans le perfusat en réponse à la phase de chargement avec le  $^3\text{H}$ -DOG.

Afin de limiter les effets négatifs de ce protocole de chargement du  $^3\text{H}$ -DOG sur la performance cardiaque nous avons par la suite testé sur un nombre restreint de cœurs l'effet de trois modifications à ce protocole sur la fonction contractile du cœur:

1. Nous avons évalué l'effet de perfuser le cœur en circuit ouvert durant la phase de chargement du  $^3\text{H}$ -DOG, plutôt que la recirculation de 100 mL en circuit fermé.
2. Nous avons évalué l'effet d'ajouter au tampon de perfusion des substrats alternatifs normalement oxydés par le cœur soit le lactate (0,5 mM) et le pyruvate (0,1 mM). Ces substrats étaient présents dans un

rapport physiologique de 5 : 1 de manière à minimiser les perturbations de l'état rédox cytosolique.

3. Nous avons finalement évalué l'effet de diminuer la période de chargement du [ $^3\text{H}$ ]-DOG de 30 à 20 min à la fois sur la fonction cardiaque et sur les comptes de radioactivité.

### **5.6 Isolation des mitochondries et mesure de radioactivité**

À la fin de la perfusion, le cœur était rapidement retiré de la canule et plongé dans 5 mL de tampon d'homogénéisation (en mM : 300 sucrose, 10 Tris-HCl, 2 EGTA, 5 BSA, pH 7,4) puis pesé. Les ventricules étaient ensuite hachés finement à l'aide de ciseaux puis homogénéisés à l'aide d'un Polytron (1 cycle de 5 sec à puissance 3). Le volume de tampon était ensuite complété à 40 mL puis un aliquot de 500  $\mu\text{L}$  prélevé pour la mesure de la radioactivité dans l'homogénat total. L'homogénat était centrifugé pendant 2 min à 800 g de manière à faire précipiter les débris cellulaires puis le surnageant était récupéré et centrifugé pendant 10 min à 10 000 g pour faire précipiter les mitochondries. Le culot de mitochondries était ensuite repris dans 30 mL de tampon sucrose sans BSA et centrifugé de nouveau pendant 10 min à 10 000 g. Le culot de cette centrifugation était finalement resuspendu dans le tampon sucrose sans BSA de manière à obtenir un volume total de  $\sim 1$  mL. Un premier aliquot (100  $\mu\text{L}$ ) de la suspension mitochondriale était congelé immédiatement pour le dosage ultérieur de la citrate synthase (voir dosage enzymatiques). Un second aliquot de 500  $\mu\text{L}$  était réservé à la mesure de la radioactivité et le reste ( $\sim 400$   $\mu\text{L}$ ) utilisé pour évaluer la fonction respiratoire. Pour la mesure de la radioactivité, les échantillons d'homogénat total et de fraction mitochondriale étaient dilués avec un volume équivalent d'acide perchlorique 5%

vol/vol puis centrifugé pendant 10 min à 10 000 g. 500  $\mu$ L du surnageant de cette centrifugation était ajouté à 10 mL de scintillant puis analysé au compteur bêta au minimum 24 heures après.

### 5.7 Calcul de l'index de séquestration mitochondriale du [ $^3$ H]-DOG

Le calcul de l'index de séquestration mitochondriale du [ $^3$ H]-DOG a été effectué à l'aide de l'équation suivante décrite par le groupe de Halestrap [75] :

$$\text{Index DOG} = [\text{dpm mitochondrial/activité CS}] / [\text{dpm homogénat} / \text{g tissu frais}]$$

Dans cette équation *dpm mitochondrial* représente la radioactivité mesurée dans la fraction mitochondriale en dpm/mL, *activité CS* représente l'activité de la citrate synthase dans la fraction mitochondriale en mU.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>, dpm homogénat représente la radioactivité mesurée dans l'homogénat total en dpm normalisée en fonction du poids frais des ventricules.

### 5.8 Mesure de la respiration mitochondriale

La fonction respiratoire des mitochondries a été évaluée par méthode polarographique en duplicata dans deux chambres de respiration reliées à un système d'acquisition de données (Oxygraph, Hansatech, King Lynn UK). Les mitochondries (0.3 mg prot) ont été incubées dans un tampon KCl (en mM : 110 KCl, 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 MOPS, pH 7,4) en présence de donneurs d'électrons pour le complexe I (en mM : 5 glutamate, 2,5 malate). Après enregistrement de la respiration basale ( $V_0$ ), 1 mM d'ADP était ajouté pour obtenir la respiration maximale en condition phosphorylante ( $V_{ADP}$ ). Pour chaque test, le ratio de contrôle respiratoire ( $\text{RCR} = V_{ADP}/V_0$ ) était déterminé à titre d'index supplémentaire de la fonction respiratoire.

## 5.9 Dosages enzymatiques

La mesure de l'activité maximale des enzymes mitochondriales a été effectuée par technique spectrophotométrique sur le tissu ventriculaire pulvérisée dans l'azote liquide. Après décongélation, les échantillons ont été homogénéisés dans un tampon d'homogénéisation (en mM : 250 sucrose, 40 KCl, 2 EGTA, 20 Tris-HCl et suppléé avec 1mg/mL de BSA) à l'aide d'un Polytron (2 cycle de 10 sec à puissance 3). Chaque homogénat était divisé en deux portions et était mis en absence ou en présence de 0,1 % triton X-100. Ensuite, il y avait sonication des échantillons à 4 °C (2 cycles de 10 sec à 40 % puissance maximale) et incubation pour 60 min sur la glace. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 2 000 g pendant 8 min. L'activité de la citrate synthase, de la cytochrome oxydase et des complexes I+III a été déterminée dans le surnageant des échantillons traités au Triton et celle des complexes I et II sur le surnageant des échantillons non traités. L'activité enzymatique était exprimée en  $\text{mU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ .

*Complexe I:* L'activité du complexe I a été déterminée en suivant la vitesse d'oxydation du NADH à 340 nm en présence de décylubiquinone ( $100\mu\text{M}$ ) comme accepteur d'électron. Le dosage a été effectué dans un tampon Tris 10mM à pH 8.0 supplémenté avec  $0,4\mu\text{M}$  d'antimycine A et  $0,25\text{ mM}$  de cyanure de manière à bloquer l'activité des complexes respiratoires situés en aval du complexe I. À la fin de chaque dosage,  $4\mu\text{M}$  de roténone était ajouté afin de déterminer la vitesse d'oxydation du NADH non spécifique au complexe I. L'activité du complexe I était obtenue par différence entre les pentes mesurées avant et après l'ajout de roténone (activité roténone-insensible).

*Complexe II:* L'activité du complexe II a été déterminée en suivant la vitesse de réduction du DCIP (600 nm) par le complexe II en présence du succinate et de décyubiquinone comme substrats. Le dosage a été effectué dans un tampon KPi-EDTA à pH 7,8 (en mM : 50  $K_2HPO_4$ , 50  $KH_2PO_4$  et 2 EGTA) supplémenté avec 4  $\mu$ M roténone et 0,24 mM cyanure de manière à inhiber les complexes en amont et en aval du complexe II. À la fin de chaque dosage, 10 mM de malonate était ajouté afin de déterminer la vitesse de réduction du DCIP non spécifique au complexe II. L'activité du complexe II a été obtenue par la différence entre les deux pentes mesurées avant et après l'ajout de malonate.

*Complexe I+III:* L'activité combinée du complexe I+III est déterminée en mesurant la vitesse de réduction du cytochrome c (8 mM) par le complexe III en présence de NADH comme donneur d'électron au complexe I. En suivant l'augmentation de l'absorbance (550 nm) du cytochrome c causée par sa réduction en présence de NADH comme donneur d'électron. Le dosage a été effectué dans un tampon Tris 10mM à pH 8,0 supplémenté avec du cyanure (0,4 mM) de manière à bloquer l'oxydation du cytochrome c par le complexe IV. À la fin de chaque dosage, 4 $\mu$ M de roténone était ajoutée de manière à déterminer la vitesse de réduction du cytochrome c non spécifique. L'activité des complexes I+III a été obtenue par la différence entre les pentes mesurées avant et après l'ajout de roténone.

*Complexe IV:* L'activité du complexe IV a été déterminée en suivant la vitesse d'oxydation du cytochrome c (550 nm). Le dosage a été effectué dans un tampon KPi à pH 7,8 (en mM : 50  $K_2HPO_4$ , 50  $KH_2PO_4$ ) et préalablement bullé en présence de 11,5mM de dithionit de manière à causer la réduction du cytochrome c.

*Citrate synthase* : L'activité de la citrate synthase a été déterminée en suivant la vitesse de transfert de groupements sulfhydryls de l'acetyl-CoA vers le DTNB mesuré à 412nm. Le dosage a été effectué dans un tampon Tris 50mM à pH 8,0 supplémenté 0,1 mMDTNB, 0,3 mM acétyl-CoA, et 0,5 mM oxaloacétate.

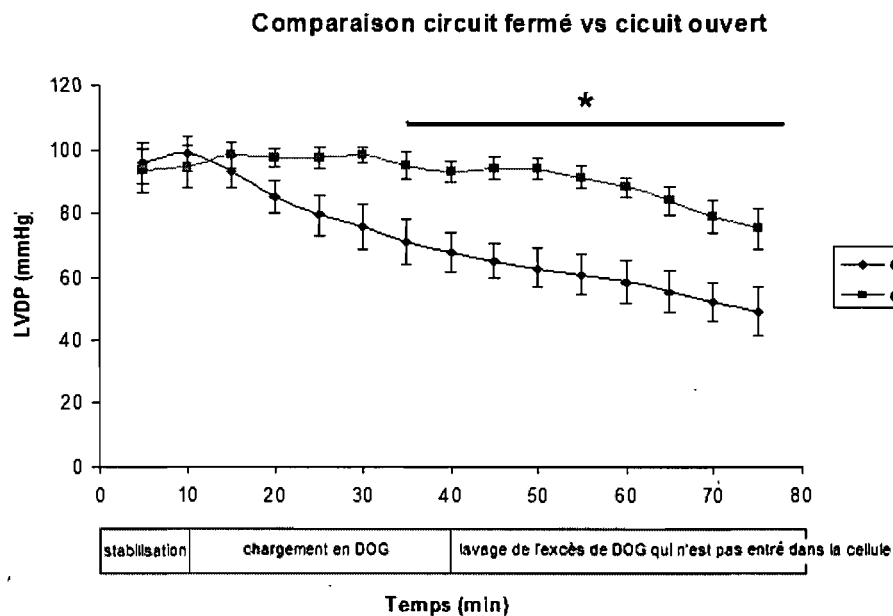
*LDH* : L'activité de la LDH a été déterminée dans le perfusat coronarien en suivant la vitesse d'oxydation du NADH à 340 nm. Le dosage a été effectué dans un tampon KPi à pH 7,4 (en M: 1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en présence de 4mM de pyruvate et 0,15mM de NADH. La quantité de LDH relâchée était calculée à l'aide du débit coronaire mesuré au moment du prélèvement du perfusat et normalisée en fonction du poids du cœur.

## 6 RÉSULTATS

### 6.1 Optimisation du protocole de chargement avec le [<sup>3</sup>H]-DOG

Dans les premières expériences effectuées, nous avons comparé le protocole de chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG avec recirculation du tampon K-H (*i.e.* circuit fermé) utilisé précédemment à un protocole effectué avec un tampon identique mais qui n'était pas recirculé (*i.e.* en circuit ouvert). La figure 32 montre l'évolution des paramètres contractiles enregistrés au cours d'une perfusion normoxique de 75 minutes pendant laquelle le chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG était effectué entre la 10<sup>e</sup> et la 40<sup>e</sup> minute. La perfusion du [<sup>3</sup>H]-DOG en circuit fermé a mené à une chute progressive de plus de 45 % la pression développée partant de 98,7 ± 5,5 mm Hg immédiatement avant la phase de chargement (*i.e.* à 10 min) jusqu'à 67,8 ± 6,2 mm Hg 35 min après le rétablissement de la perfusion en circuit ouvert (*i.e.* à 75 min). En comparaison, la perfusion du [<sup>3</sup>H]-DOG en circuit ouvert a permis un meilleur maintien de la pression développée avec une diminution de moins de 2 % entre la 10<sup>e</sup>

( $94,7 \pm 6,6$ ) et la 75<sup>e</sup> minute ( $93,2 \pm 3,3$ ) de perfusion. Un phénomène similaire était observé au niveau du RPP, un index de travail mécanique du cœur. Par ailleurs, seules de légères diminutions de la fréquence cardiaque ont été observées au cours des perfusions et aucune différence significative n'a été observée entre la condition circuit fermé et circuit ouvert.

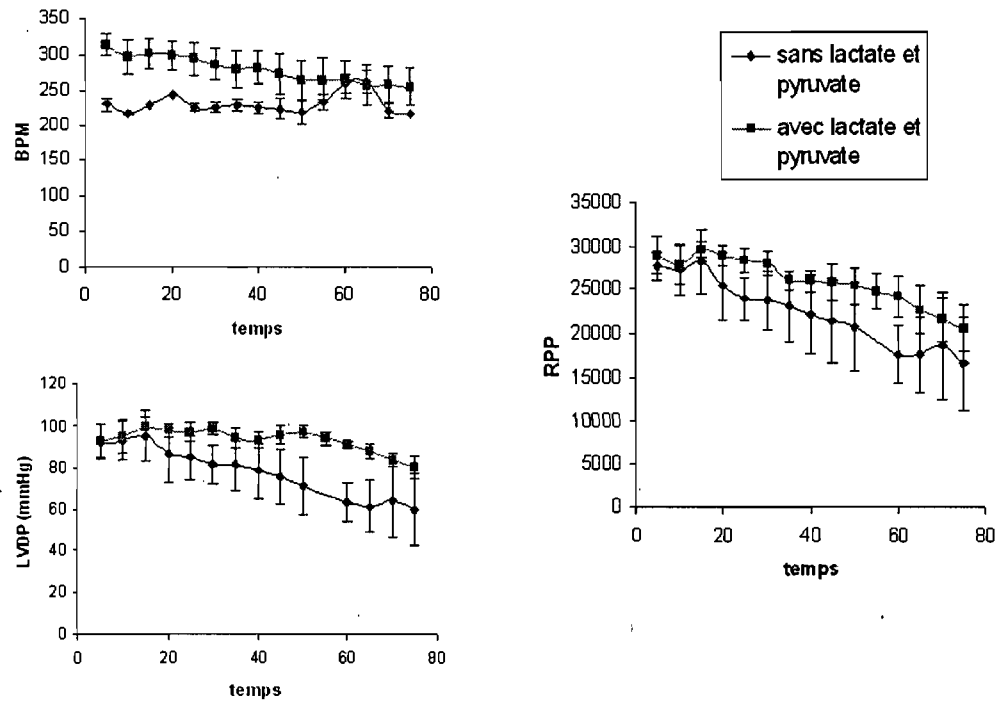


**Figure 32: Réponse du myocarde à 30 minutes de chargement en circuit fermé (n=8) ou ouvert (n=4) de [<sup>3</sup>H]-DOG chez le Rat SD.** La figure montre l'évolution de la pression ventriculaire développée LVDP. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. \* : significativement différent de la condition circuit fermé,  $p < 0,05$ .

Dans le protocole proposé par le groupe de Halestrap [75], le glucose (à une concentration de 11 mM) constitue le seul substrat énergétique fourni au cœur. Nous avons donc évalué si l'ajout de lactate et de pyruvate (L+P) comme substrats additionnels permettait de limiter davantage la perte de fonction contractile. La figure 33 montre l'évolution des fonctions contractiles lors de protocoles de chargement au [<sup>3</sup>H]-DOG en circuit ouvert en présence ou en absence d'un mélange L+P. Dans ces conditions, aucun effet bénéfique significatif de l'ajout de L+P n'a été observé, bien que les fonctions tendaient à être légèrement supérieures. Par ailleurs comme le lactate et le pyruvate sont des substrats énergétiques oxydés par le cœur *in*



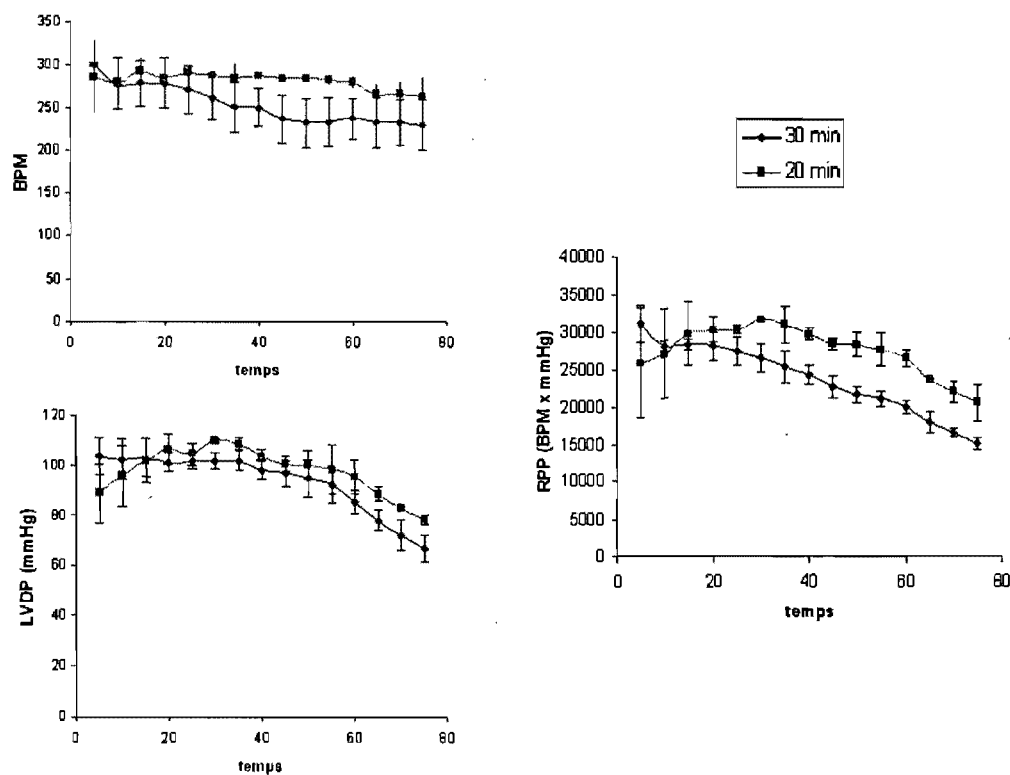
*in vivo* et que leur ajout n'a pas causé de diminution notable du transport du [ $^3\text{H}$ ]-DOG dans les cardiomyocytes (voir ci bas), ce mélange de substrat a été utilisé dans l'ensemble des perfusions effectuées ultérieurement.



**Figure 33: Réponse du myocarde à 30 minutes de chargement en circuit ouvert de DOG froid chez les rats SD avec un tampon contenant 0,5mM lactate et 0,1mM pyruvate (n=4) ou sans (n=2).** La figure montre l'évolution de la fréquence cardiaque (BPM), de la LVDP et du RPP. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M.

Par ailleurs, nous avons effectué des perfusions visant à déterminer s'il était possible de diminuer le temps d'exposition au [ $^3\text{H}$ ]-DOG sans avoir un impact notable sur la quantité de traceur s'accumulant dans les cardiomyocytes. Après 30 min de perfusion en circuit ouvert, l'accumulation de [ $^3\text{H}$ ]-DOG dans le cœur était de  $66\,326 \pm 11\,794$  DPM/g de tissu (n=2). Nous n'avons pas observé de réduction de l'accumulation de [ $^3\text{H}$ ]-DOG tissulaire en retranchant la période de chargement à 20 min ( $73\,613 \pm 2\,314$  DPM/g de tissu, n=2). Par ailleurs, bien qu'aucune différence significative n'ait été notée en raison du faible échantillonnage, les paramètres

contractiles mesurées à la 75<sup>e</sup> minute de perfusion étaient 9-30 % plus élevés dans les cœurs ayant subi 20 min de chargement comparativement aux cœurs ayant subi 30 min de chargement (Figure 34, LVDP :  $78,0 \pm 1,8$  vs  $66,4 \pm 5,2$  mm Hg; RPP:  $20\ 540 \pm 2\ 310$  vs  $15\ 081 \pm 779$ ) (bmp x mm Hg). À l'issue de ces expériences, les perfusions ultérieures ont donc été effectuées avec un tampon contenant du L+P et en utilisant le 20 min de chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG en circuit ouvert.



**Figure 34: Réponse du myocarde à 30 (n=2) ou 20 minutes (n=2) de chargement en circuit ouvert du DOG chez le Rat SD.** La figure montre l'évolution de la fréquence cardiaque (BPM), de la LVDP et de l'index RPP. Les valeurs sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.

## 6.2 Remodelage ventriculaire pathologique et ses conséquences chez le Rat WKHA

### 6.2.1 Paramètres morphologiques

Le tableau IV présente les paramètres morphologiques observés chez les rats WKHA 12 semaines après l'induction de l'ACF. Comparativement aux animaux contrôles, les animaux ACF présentaient une hypertrophie bi-ventriculaire marquée,

que la masse soit exprimée en terme absolu ou relative à la longueur des tibias. Le poids des poumons était en moyenne 33 % supérieur chez les ACF comparativement aux contrôles, témoignant d'un début de congestion pulmonaire. Par ailleurs, le poids et l'apparence générale du foie n'étaient pas significativement différents. Aucun des animaux ACF étudiés dans ce projet ne présentait d'ascites et l'occurrence de mortalité a été nulle au cours de la durée de ce projet.

**Tableau IV: Données morphométriques et rendement de l'isolation des mitochondries chez les rats Sham et ACF.**

	Sham	ACF
Poids de l'animal (g)	362 ± 12	410 ± 15 #
Poids du cœur (mg)	1348 ± 39	2172 ± 85 *
Poids du ventricule gauche (mg)	913 ± 37	1377 ± 39 *
Poids du ventricule droit (mg)	308 ± 16	429 ± 34 *
Poids des poumons (mg)	1312 ± 70	1748 ± 89 #
Poids du foie (g)	11,9 ± 0,4	12,3 ± 0,9
Longueur du tibia (mm)	395 ± 7	393 ± 3
Poids du coeur / longueur du tibia (mg/mm)	3,4 ± 0,1	5,4 ± 0,2 *
Poids du ventricule gauche / longueur du tibia (mg/mm)	2,3 ± 0,1	3,5 ± 0,1 *
Poids du ventricule droit / longueur du tibia (mg/mm)	0,76 ± 0,05	1,03 ± 0,08 #

Les valeurs représentent la moyenne ± S.E.M. de 12 animaux dans chacun des groupes expérimentaux. \* Significativement différent des sham, P<0,01. # Significativement différent des sham. P<0,05.

### 6.2.2 Activité des enzymes mitochondriales

Le tableau V présente les résultats des analyses enzymatiques effectuées sur le tissu ventriculaire des animaux ACF et contrôles. Aucune différence significative entre les ACF et les contrôles n'était apparente au niveau de l'activité des complexes I, II, I+III et IV de la chaîne respiratoire ainsi qu'au niveau de l'activité de la citrate synthase, impliquée dans le cycle de Krebs. Fait notable, la quantité de mitochondries récupérées par gramme de tissu au cours de nos procédures d'isolation était également semblable dans les deux groupes (15,6 ± 1,6 et 16,0 ± 0,9 mg prot / g de ventricule chez les contrôles et les ACF respectivement).

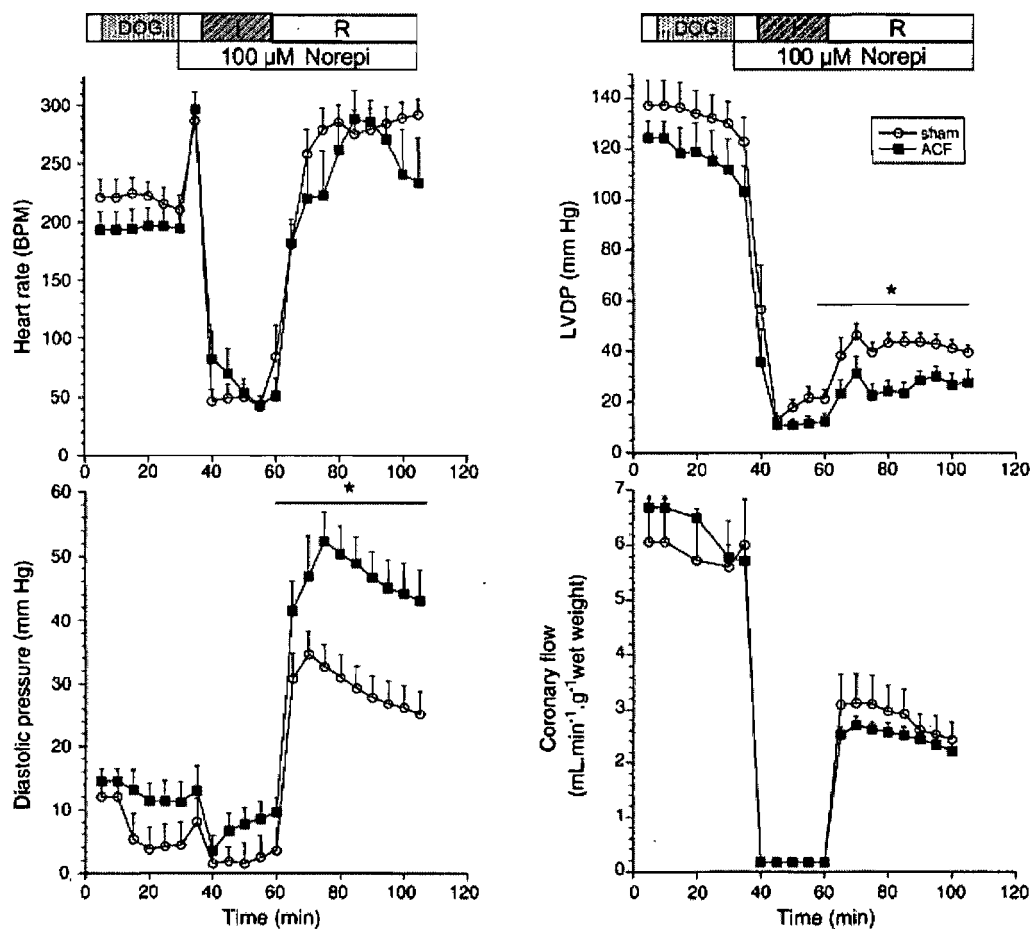
**Tableau V: Activité des enzymes mitochondriales chez les rats sham et ACF.**

	Sham (mU/mg protéine)	ACF (mU/mg protéine)
NADH-ubiquinone oxydoréductase (complexe I)	0,63 ± 0,07	0,53 ± 0,05
Succinate-ubiquinone réductase (complexe II)	0,34 ± 0,04	0,30 ± 0,03
Cytochrome c oxydase (complexe IV)	1,99 ± 0,12	2,15 ± 0,14
NADH-cytochrome c oxydoréductase roténone sensible (complexes I+III)	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,02
Citrate synthase	0,78 ± 0,03	0,76 ± 0,04

Les valeurs représentent la moyenne ± S.E.M. de 6 animaux dans chacun des groupes.

### 6.2.3 Réponse cardiaque à l'ischémie-réperfusion

La Figure 35 présente l'évolution de la fréquence cardiaque, de la pression développée, de la pression diastolique ainsi que du débit coronaire observé chez les cœurs contrôles et ACF soumis à une ischémie-réperfusion.



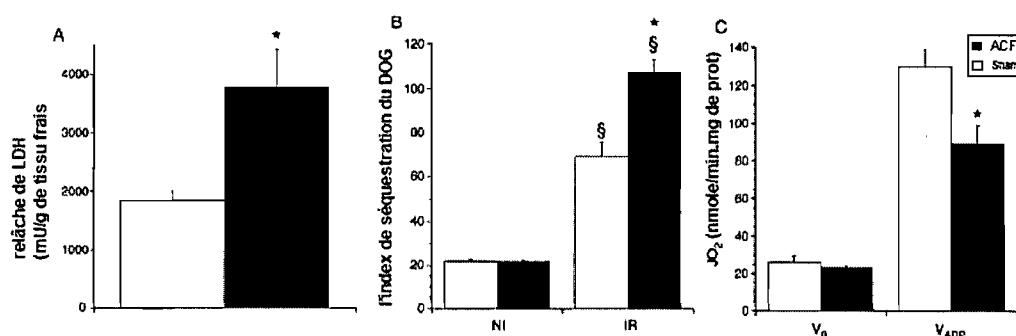
**Figure 35: Réponse du myocarde à une ischémie-réperfusion *ex vivo* chez des animaux Sham et ACF. La figure montre l'évolution de la fréquence cardiaque**

(BPM), la pression développée par le ventricule gauche (LVDP), la pression diastolique et du débit coronarien chez des cœurs Sham et ACF soumis à une ischémie à faible débit (3% du débit coronarien préischémique) avec présence d'un stress adrénérgique (100  $\mu$ M noradrénaline). Par souci de clarté, les valeurs obtenues pour les cœurs qui n'ont pas été soumis à une I-R (n=4 dans chacun des groupes) et qui ont servi à déterminer les valeurs basales de distribution du [ $^3$ H]-DOG ne sont pas représentées. Après une période initiale de 10min de stabilisation, les cœurs sont perfusés avec le tampon KH contenant du [ $^3$ H]-DOG tel qu'indiqué. 5min avant l'ischémie, le cœur est perfusé avec du tampon KH sans radioactivité pour éliminer le [ $^3$ H]-DOG extracellulaire. Durant cette phase, l'infusion de norépinéphrine (100 $\mu$ M) est amorcée et maintenue pour le reste de la perfusion. La LVDP est calculée par différence entre les pressions systolique et diastolique. \* : Significativement différent des Sham,  $p < 0,05$ .

Aucune différence au niveau de ces paramètres n'était décelable entre le groupe contrôle et le groupe ACF durant la période préischémique (stabilisation, chargement avec [ $^3$ H]-DOG et rinçage). Cependant, au cours de la phase de réperfusion suivant les 30 minutes d'ischémie, la récupération de la fonction contractile était significativement moindre chez les cœurs ACF comparativement aux cœurs contrôles. En effet, chez les cœurs ACF, les valeurs de pression développée, de RPP ainsi que les vitesses de contraction et de relaxation (données non représentées sur la figure 35) étaient systématiquement inférieures à celles qui étaient observées chez les cœurs contrôles. De plus, l'augmentation de la pression diastolique était en moyenne 1,7 fois supérieure chez les ACF comparativement aux contrôles. Par ailleurs, durant la réperfusion, le débit coronarien exprimé par gramme de tissu était similaire dans les deux groupes expérimentaux, indiquant que la moindre récupération des cœurs ACF n'était pas liée à une sous-perfusion du myocarde.

La relâche de LDH dans l'effluent coronarien avant l'ischémie était faible et de niveau comparable chez les cœurs ACF et contrôles ( $35 \pm 7$  mU  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  tissu frais, données des deux groupes combinés, n = 17). Cependant, la quantité totale de LDH relâchée par les cœurs ACF au cours de la période de réperfusion était environ

deux fois supérieure à la quantité relâchée par les cœurs contrôles, suggérant une perte d'intégrité sarcolemmale plus importante chez les ACF (Figure 36A). La figure 36B présente les résultats obtenus pour l'index DOG. Chez les cœurs non ischémiques, l'index DOG était faible et aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes expérimentaux ( $21,0 \pm 1,6$  et  $21,0 \pm 0,9$  pour les contrôles et les ACF respectivement). Chez les cœurs contrôles, l'I-R a donné lieu à une augmentation de l'index DOG de l'ordre de 350 % ( $69 \pm 7$ ) par rapport aux valeurs non ischémiques. En comparaison, chez les cœurs ACF, l'index DOG observé suite à l'I-R était 509 % ( $107 \pm 6$ ) plus élevé comparativement aux valeurs observées dans les cœurs non ischémiques, indiquant une plus grande ouverture du PTP chez les cœurs ACF. La figure 36C présente les résultats de l'analyse respirométrique effectuée sur les mitochondries isolées à la suite de la période d'I-R. Bien qu'aucune différence notable de respiration basale ( $V_0$ ) n'ait été observée entre les deux groupes expérimentaux, la vitesse maximale de respiration stimulée par l'ADP ( $V_{ADP}$ ) était 33 % inférieure ( $P < 0,05$ ) dans le groupe ACF comparativement au groupe contrôle. Compte tenu de cette diminution de  $V_{ADP}$ , l'indice RCR était également inférieur chez les ACF ( $5,1 \pm 0,5$  vs  $3,8 \pm 0,3$ ,  $P < 0,05$ )



**Figure 36 : Relâche de LDH, séquestration mitochondriale du  $[^3H]$ -DOG et mesure de la fonction respiratoire sur mitochondries isolées postréperfusion dans les groupes Sham et ACF.** La figure A présente l'aire sous la courbe de la relâche de LDH dans le perfusat durant la réperfusion. La relâche de LDH est calculée en multipliant la valeur du débit (en mL/min/g de tissu frais) par la concentration en LDH (en mU/min/g de tissu frais). La figure B montre l'index de séquestration du  $[^3H]$ -DOG exprimé comme le ratio DPM de la fraction mitochondriale/DPM du tissu (voir méthodologie pour plus de détails) chez les cœurs n'ayant pas subi d'ischémie (NI) ( $n=4$  dans chaque groupe) et chez les cœurs ayant

subi une I-R (n=9 et n=8 pour Sham et ACF). La figure C montre la respiration basale ( $V_0$ ) et la respiration maximale stimulée par l'ADP ( $V_{ADP}$ ) mesurée sur les mitochondries isolées à l'issue de la perfusion.



# **Chapitre 3- Discussion et conclusion**

## 7 DISCUSSION

Dans l'ensemble, les résultats du travail effectué dans ce mémoire ont d'abord permis d'améliorer la technique de séquestration mitochondriale du [ $^3\text{H}$ ]-DOG utilisée notamment par le groupe de Halestrap pour quantifier l'ouverture du PTP *in situ* dans le cœur perfusé. En effet, les modifications apportées au protocole de perfusion original ont permis de limiter l'impact négatif du protocole de chargement du traceur sur les fonctions hémodynamiques tout en permettant de maintenir une captation du [ $^3\text{H}$ ]-DOG adéquate pour une mesure précise de sa séquestration mitochondriale. L'utilisation de cette méthode a ensuite permis de confirmer au niveau du cœur entier le développement d'une vulnérabilité des mitochondries à l'ouverture du PTP induite par le stress aigu au cours de la phase d'hypertrophie compensée chez le Rat WKHA.

### 7.1 Optimisation du protocole de chargement du [ $^3\text{H}$ ]-DOG

Le groupe de Halestrap a publié plusieurs études dans lesquelles l'ouverture du PTP a été quantifiée à l'aide de la technique de la séquestration mitochondriale du [ $^3\text{H}$ ]-DOG (voir section 3.2). Dans ces études, les perfusions cardiaques ont été effectuées à débit constant (10 mL/min) avec un tampon contenant uniquement du glucose. De plus, la phase de chargement du [ $^3\text{H}$ ]-DOG était effectuée en faisant recirculer un volume relativement faible (40 mL) de tampon KH. Bien que ces études aient démontré qu'il était possible de quantifier l'ouverture du PTP dans ces conditions, la plupart d'entre elles ne permettent pas d'apprécier pleinement l'impact de cette procédure sur la fonction cardiaque puisque la cinétique de la pression de perfusion et des paramètres contractiles n'a pas été rapportée. Cependant, l'examen des fonctions contractiles qui apparaissent dans certaines de leurs études suggère que les conditions utilisées pour le chargement du [ $^3\text{H}$ ]-DOG ont un effet négatif sur ces fonctions. En effet, dans plusieurs études [75, 105] la pression ventriculaire

développée est plus faible (40-53 mm Hg) que les valeurs habituellement rapportées dans la littérature et dans ce mémoire pour des cœurs perfusés en mode Langendorff (80-100 mm Hg). De plus, dans l'étude de Kerr et al. [105] un groupe de cœurs était soumis au chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG avant la période d'I-R alors qu'un second groupe subissait le chargement après la période d'I-R. Le tableau VI tiré de cet article montre que les valeurs de pression ventriculaire développées avant l'ischémie étaient en moyenne 25% inférieures pour les cœurs chargés au [<sup>3</sup>H]-DOG avant comparativement à après l'I-R ( $40,2 \pm 1,7$  vs  $53,0 \pm 3,6$  mm Hg), suggérant un impact négatif du chargement.

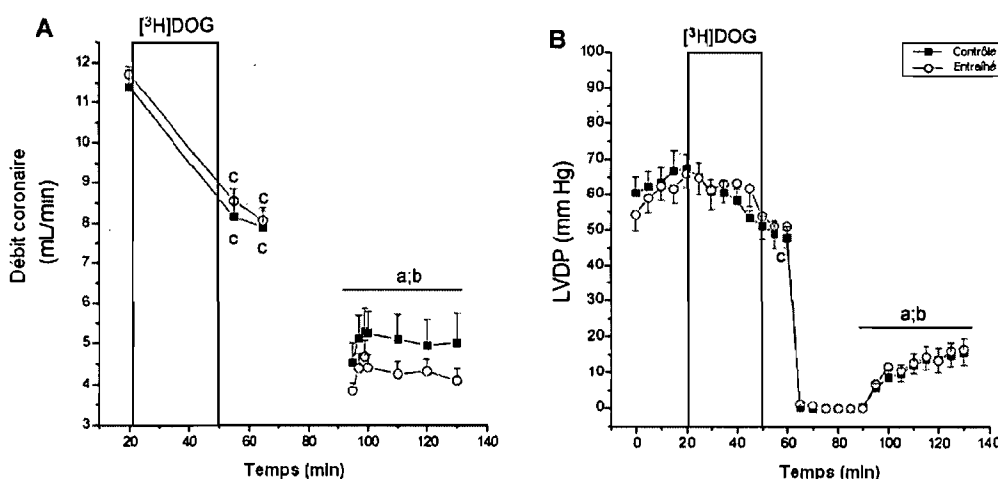
**Tableau VI : Effets du chargement du DOG en circuit fermé sur les fonctions cardiaques dans le cœur perfusé de rat.**

Treatment	n	Preischemia			Ischemia		Postischemia			
		HR, beats/min	EDP, mmHg	LVDP, mmHg	Time to ischemic contracture, min	Maximum contracture, mmHg	HR, beats/min	EDP, mmHg	LVDP, mmHg	LVDP recovery %preischemic
Control										
Preloaded	6	270 ± 11	1.9 ± 0.4	40.2 ± 1.7	11.3 ± 2.1	23.3 ± 1.5	246 ± 13	38.8 ± 1.4	15.0 ± 4.1	36.2 ± 9.9
Postloaded	5	284 ± 20	1.0 ± 0.5	53.0 ± 3.6	5.2 ± 0.7	36.3 ± 2.8	244 ± 28	42.5 ± 7.4	31.5 ± 7.4	57.2 ± 10.3

Dans cette étude, un premier groupe de cœurs étaient soumis au protocole de chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG avant l'ischémie-réperfusion (« preloaded ») alors que le second était soumis au même chargement après la période d'ischémie-réperfusion (« postloaded »). Les fonctions préischémiques, notamment la pression ventriculaire développée (LVDP) s'est avérée 25% inférieure pour les cœurs « preloaded » vs « postloaded », suggérant un impact négatif du chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG sur la fonction cardiaque. Les valeurs représentent la moyenne ± S.E.M. (adapté de Kerr et al. 1999).

Les résultats présentés dans ce mémoire de Maîtrise supportent cette hypothèse. En effet, nous avons clairement démontré que l'utilisation d'une perfusion en circuit ouvert permettait de limiter largement le déclin des fonctions contractiles associé au chargement du [<sup>3</sup>H]-DOG en circuit fermé (Figure 32). Ces résultats suggèrent donc que la perfusion en circuit fermé, plutôt que la présence du [<sup>3</sup>H]-DOG *per se*, est à l'origine du déclin de la fonction contractile. Bien que les facteurs responsables de ce phénomène demeurent incertains, nos résultats antérieurs [35] ainsi que ceux obtenus au cours de ce travail indiquent que le chargement en

circuit fermé cause une diminution marquée du débit coronaire (Figure 37) et que ce phénomène est prévenu lorsque le circuit ouvert est utilisé (Figure 35). Il est donc possible que l'effet négatif du chargement en circuit fermé sur les fonctions contractiles soit relié à l'accumulation de métabolites cardiaques vasoconstricteurs (ex : les catécholamines relâchées par les terminaisons sympathiques, des prostaglandines, des ROS, des cytokines et des facteurs de croissances) et à une sous-perfusion du myocarde.



**Figure 37: Évolution du débit coronaire et de la pression ventriculaire développée (LVDP) observée dans l'étude de Ciminelli et al (2006).** Cette figure présente l'évolution A) du débit coronaire et B) de LVDP de cœurs provenant d'animaux sédentaires (cercles) et entraînés (carrés). Une diminution significative du débit coronaire et de LVDP a été observée dans les deux groupes expérimentaux en réponse à la phase de chargement du  $[^3\text{H}]\text{-DOG}$  en circuit fermé avec 100 mL de tampon KH. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. pour un n de 9 à 11 cœurs par groupe. a : significativement différent ( $p < 0,05$ ) des valeurs préischémiques à T= 60min dans le groupe contrôle. b : Significativement différent ( $p < 0,05$ ) des valeurs pré-ischémiques à T= 60min dans le groupe entraîné. c : significativement différent ( $p < 0,05$ ) des valeurs préchargement à T= 20min. (adapté de Ciminelli et al 2006).

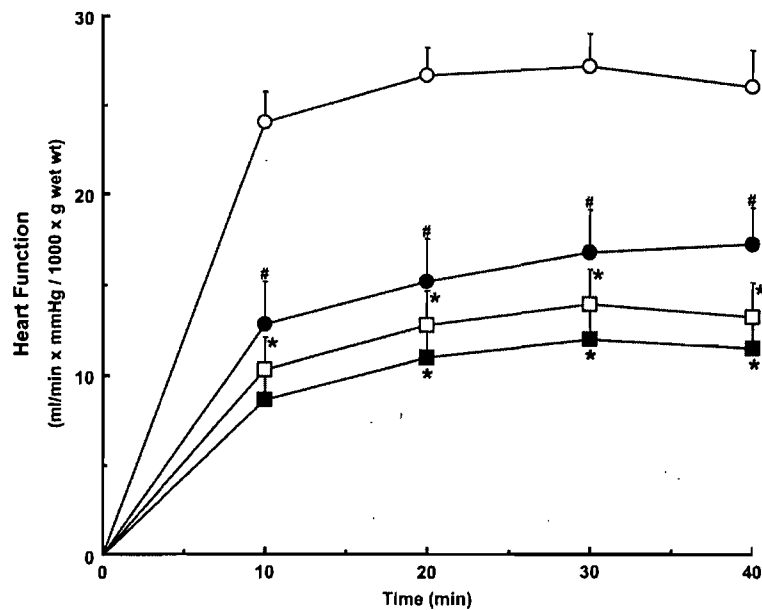
## 7.2 Modification de la capacité oxydative durant la phase compensée d'hypertrophie.

Plusieurs études ont évalué l'effet du remodelage ventriculaire pathologique sur la morphologie et la fonction mitochondriale, en particulier sur la capacité à produire de

l'ATP. Tel que mentionné dans la revue de littérature, une réduction de l'activité de certaines enzymes mitochondriales, des dysfonctions au niveau de certains complexes de la chaîne respiratoire, notamment les complexes I et IV, ainsi que de la fonction respiratoire sur des mitochondries isolées a été rapporté autant chez l'Homme que dans des modèles animaux d'hypertrophie cardiaque pathologique. Cependant, la majorité de ces observations a été faite à un stade avancé d'insuffisance cardiaque [96, 98, 114, 139, 144, 154]. Toutefois, lors de la phase compensée d'hypertrophie, la majorité des études disponibles ont rapporté peu de changement, voire même une amélioration de la fonction respiratoire [51, 111, 116, 157, 160]. Nos résultats sont en accord avec ces données. En effet, douze semaines après induction de l'ACF, un moment où aucune dysfonction systolique n'est encore apparente [158], nous n'avons observé aucun changement de l'activité de la citrate synthase et des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire (Tableau V). Par contre, d'autres études de notre laboratoire ont montré que la fonction respiratoire ainsi que le potentiel de membrane mitochondrial était également normal chez les animaux ACF comparativement aux contrôles (Figure 29). Par contre, comme il l'a été mentionné, cette apparente absence de dysfonctions flagrante est en partie reliée aux conditions expérimentales utilisées pour effectuer les mesures qui ne placent pas les mitochondries en état de stress. Cependant, chez le rat spontanément hypertendu (SHR) l'expression et l'activité de la NADP<sup>+</sup>-isocitrate déshydrogénase mitochondriale et de l'aconitase (qui sont sensibles au stress oxydatif) sont diminuées avant même l'apparition d'une hypertrophie cardiaque [13, 14], ce qui suggère qu'une production accrue de radicaux libres peut survenir durant la phase précoce de la pathologie sans autre dysfonction mitochondriales apparentes.

### 7.3 Modification de la vulnérabilité au stress

Plusieurs études ont par ailleurs démontré qu'en période compensée d'hypertrophie, le myocarde devient plus vulnérable aux dysfonctions induites en condition de stress, notamment à l'ischémie-réperfusion. Plusieurs études, effectuées à l'aide du modèle de surcharge pressive induite par constriction de l'aorte abdominale chez le Rat, ont effectivement montré qu'à l'état compensé d'hypertrophie, les cœurs isolés et perfusés *ex vivo* en mode travaillant affichaient une moins bonne récupération fonctionnelle que les cœurs contrôles suite à une période d'I-R [146, 147] (Figure 38). Les résultats obtenus dans notre étude sont en accord avec ces observations et démontrent que le même phénomène existe chez les cœurs hypertrophiés en réponse à une surcharge volumique plutôt que pressive.

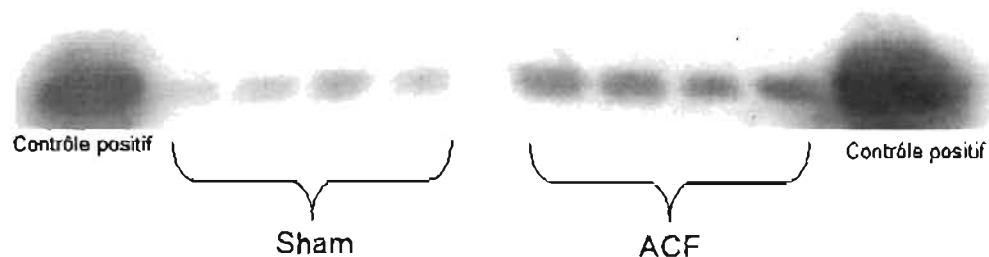


**Figure 38: Récupération de la fonction cardiaque de cœurs normaux et hypertrophiés à la suite d'une période d'ischémie.** Cette figure présente le pourcentage de récupération de la puissance cardiaque durant la réperfusion suite à une ischémie globale de 20-30 min chez des cœurs normaux et hypertrophiés (mâle et femelle) perfusés *ex vivo* en mode travaillant. L'hypertrophie était induite par constriction de l'aorte abdominale 8 semaines avant l'expérience. Cercles vides : contrôle mâle (n=21), cercles pleins : cœurs hypertrophiés mâles (n=27), carrés

vides : cœurs contrôles femelles (n=17), carrés pleins : cœurs hypertrophiés femelles (n=18). \*significativement différents vs le même sexe chez les cœurs sans hypertrophie ( $p < 0,05$ ). # significativement différents vs les cœurs de mâles correspondants ( $p < 0,05$ ). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. (Saeedi et al 2006).

Nos résultats montrent que la moindre récupération fonctionnelle ainsi que le dommage cellulaire accru (tel que reflété par la relâche de LDH dans le perfusât) observé dans les cœurs ACF étaient associés à une plus grande séquestration mitochondriale du [ $^3$ H]-DOG (index DOG de  $107 \pm 6$  vs  $69 \pm 7$ ) au cours de la réperfusion, indiquant une plus grande ouverture du PTP. Ces résultats sont compatibles avec les études que nous avons effectuées précédemment sur mitochondries isolées qui montraient une plus grande ouverture du pore suivant une période d'anoxie ou une surcharge calcique chez les ACF comparativement aux contrôles (Figure 30). Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire montrent également que l'ouverture accrue du PTP dans les cœurs ACF est associée à une plus grande relâche de cytochrome c et de Smac/Diablo dans le cytosol (Figure 39), ce qui laisse présager une activation accrue de la voie mitochondriale de la mort cellulaire.

#### A) cytochrome c

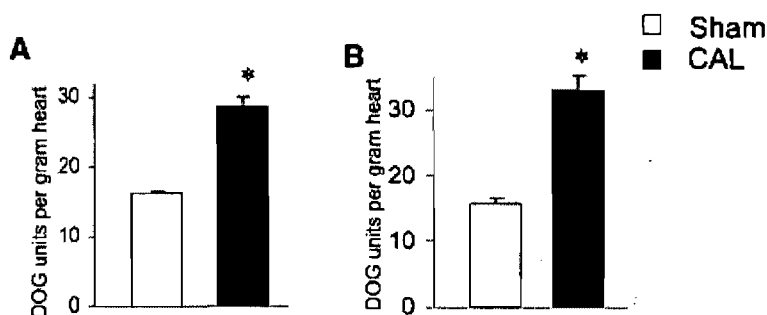


#### B) Smac/Diablo



**Figure 39: Relâche de cytochrome c et de Smac/Diablo dans le cytosol lors d'une ischémie réperfusion sur des cœurs d'animaux Sham (n=4) et ACF (n=4).**

Par ailleurs, il est important de noter que lors des perfusions normoxiques en absence de stress, l'index d'ouverture du PTP était faible et similaire dans les cœurs ACF et les contrôles (Figure 36). Ceci suggère qu'au stade compensé de la pathologie, l'ouverture du PTP ne survient pas spontanément sans qu'un stress aigu ne soit imposé. Cependant, comme il l'a été discuté dans la revue de littérature, il a récemment été démontré que lorsque l'état d'insuffisance est atteint, l'ouverture du PTP, mesuré à l'aide du [<sup>3</sup>H]-DOG, survient spontanément en absence de stress exogène [99] (Figure 40).



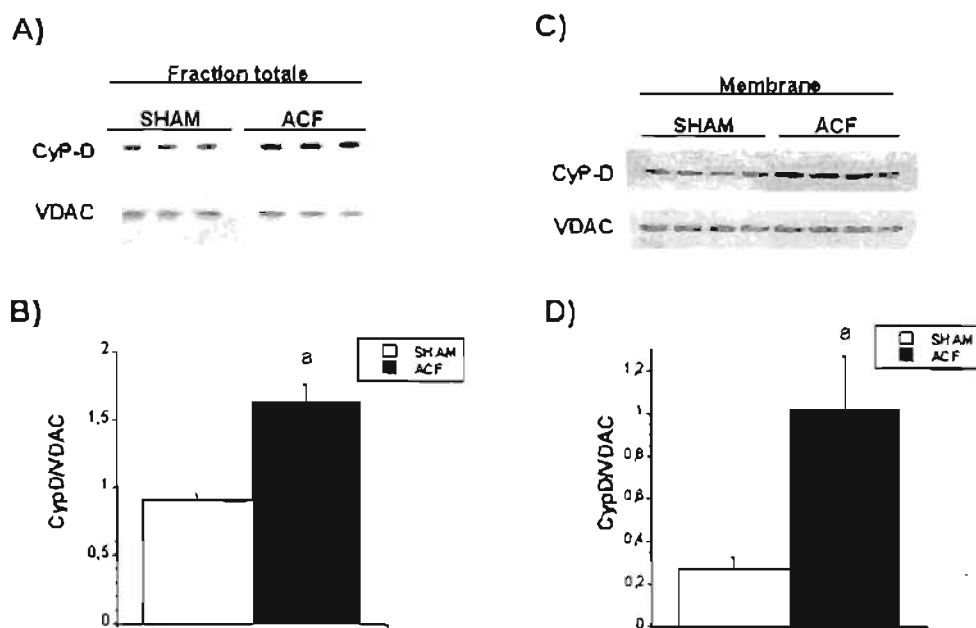
**Figure 40: Ouverture du PTP représentée en unité DOG dans les mitochondries cardiaques isolées de rats de 12 sem (A) et 18 sem (B) après une ligature d'une artère coronaire (CAL) ou non (Sham). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  S.E.M. de 8 à 9 animaux par groupe. \* Significativement différent entre le groupe CAL et Sham ( $P < 0,01$ ) (adapté de Javadov et al 2005).**

Cet état est également accompagné de dysfonctions respiratoires évidentes *in vitro* sur mitochondries isolées. Dans l'ensemble ces données suggèrent donc que la vulnérabilité à l'ouverture du PTP précède l'apparition de dysfonctions respiratoires typiques au stade d'insuffisance.

Cette vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP pourrait être en partie reliée à une augmentation de l'expression de la cyclophiline D et de son recrutement à la membrane interne. En effet, bien que l'effet du remodelage ventriculaire pathologique sur l'expression de la cyclophiline-D demeure inconnues, quelques



évidences suggèrent que son expression et sa localisation à la membrane rendent les mitochondries plus vulnérables à l'ouverture du PTP. La première évidence est que l'expression de la Cyp-D varie d'un tissu à l'autre et est corrélée avec la susceptibilité des mitochondries de ces tissus à l'ouverture du PTP [25, 61]. La seconde évidence est que l'inactivation ou la sur-expression du gène de la Cyp-D résulte en une désensibilisation ou une facilitation de l'ouverture du PTP avec des conséquences sur la mort cellulaire [9]. Enfin, la troisième évidence est que l'inhibition par la cyclosporine-A du recrutement de la Cyp-D à la membrane *in vitro* résulte en une importante désensibilisation à des agents inducteurs du pore [41]. Cette hypothèse est supportée par des travaux récents menés dans notre laboratoire qui démontrent que la surcharge volumique chez le Rat WKHA augmente l'expression et la localisation à la membrane de la cyclophiline-D (Matas et al. Résultats non-publiés).



**Figure 41: Expression de la cyclophiline-D (Cyp-D) dans la fraction mitochondriale totale (A et B) et dans la fraction mitochondriale membranaire (C et D) chez des rats ACF et Sham WKHA de 12 semaines. A et C) gels représentatifs pour l'expression de la Cyp-D et de VDAC et B et D) quantification de la densité optique de la Cyp-D normalisée par rapport à l'expression du contrôle interne VDAC. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  S.E.M. de 6 animaux par**

groupe. <sup>a</sup> Différence significative entre le groupe ACF et Sham ( $P < 0,05$ ) (Matas et al Résultats non publiés).

## 8 CONCLUSION

Pris dans leur ensemble les résultats de nos expériences fournissent la première démonstration que dans les cœurs en remodelage ventriculaire pathologique, une vulnérabilité mitochondriale à l'ouverture du PTP se développe au cours de la phase compensée d'hypertrophie alors que les mitochondries ne présentent aucune dysfonction respiratoire évidente à l'état basal. Ce phénomène a été observé *in vitro* sur des mitochondries isolées et *in situ* dans le cœur entier perfusé. Nous pensons que ce phénomène pourrait jouer un rôle dans la progression vers la décompensation cardiaque. En effet, les cardiomyocytes d'un cœur hypertrophié sont exposés de manière chronique à des stress qui favorisent l'ouverture du PTP tels qu'une augmentation de la production de radicaux libres [34, 71, 113], une modification de l'homéostasie calcique [11, 174], et des ischémies transitoires partielles [71, 139]. L'incapacité de certaines mitochondries à tolérer ces stress pourrait déclencher l'ouverture du PTP, l'activation de la mort cellulaire et la perte de myocytes cardiaques. Ceci pourrait engendrer un cercle vicieux augmentant sans cesse le niveau de stress infligé au cardiomyocytes menant ainsi à la décompensation cardiaque.

# BIBLIOGRAPHIE

1. A.M.A., *2002 Heart and Stroke Statistical Update*. Dallas, TX: American Heart Association. 2001.
2. Adrain, C., E.M. Creagh, and S.J. Martin, *Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2*. *Embo J*, 2001. **20**(23): p. 6627-36.
3. Allard, M.F., et al., *Calcium overload during reperfusion is accelerated in isolated hypertrophied rat hearts*. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. **26**(12): p. 1551-63.
4. Anderson, P.G., et al., *Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat hearts*. *Circ Res*, 1990. **67**(4): p. 948-59.
5. Anderson, P.G., Viera, L., Ye, YZ., Beckman, J.S., *Increased peroxynitrite during ischemia and reperfusion in hypertrophied rat hearts*. *J Mol Cell Cardiol* 1998. **30**: p. A236.
6. Argaud, L., et al., *Preconditioning delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(1): p. 115-22.
7. Ashikaga, H., J.W. Covell, and J.H. Omens, *Diastolic dysfunction in volume-overload hypertrophy is associated with abnormal shearing of myolaminar sheets*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(6): p. H2603-10.
8. Azzi, A. and G.F. Azzone, *Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria. III. Irreversible swelling induced by inorganic phosphate and Ca<sup>2+</sup>*. *Biochim Biophys Acta*, 1966. **113**(3): p. 438-44.
9. Baines, C.P., et al., *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7033): p. 658-62.
10. Baines, C.P., et al., *Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death*. *Nat Cell Biol*, 2007.
11. Balke, C.W. and S.R. Shorofsky, *Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure*. *Cardiovasc Res*, 1998. **37**(2): p. 290-9.
12. Basso, E., et al., *Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(19): p. 18558-61.
13. Benderdour, M., et al., *Decreased cardiac mitochondrial NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(5): p. H2122-31.
14. Benderdour, M., et al., *Cardiac mitochondrial NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation: an event that precedes hypertrophy development*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(46): p. 45154-9.
15. Benjamin, E.J. and D. Levy, *Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality?* *Am J Med Sci*, 1999. **317**(3): p. 168-75.
16. Berenji, K., et al., *Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(1): p. H8-H16.
17. Bernardi, P., et al., *The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target*. *Febs J*, 2006. **273**(10): p. 2077-99.
18. Bernardi, P., et al., *Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(5): p. 2934-9.

19. Borle, A.B. and R.T. Stanko, *Pyruvate reduces anoxic injury and free radical formation in perfused rat hepatocytes*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(3 Pt 1): p. G535-40.
20. Borutaite, V., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(4): p. 357-66.
21. Bowsher, C.G. and A.K. Tobin, *Compartmentation of metabolism within mitochondria and plastids*. *J Exp Bot*, 2001. **52**(356): p. 513-27.
22. Broekemeier, K.M. and D.R. Pfeiffer, *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*, 1995. **34**(50): p. 16440-9.
23. Brookes, P.S., et al., *Increased sensitivity of mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide in cardiac hypertrophy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(1): p. 69-82.
24. Brower, G.L. and J.S. Janicki, *Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(2): p. H674-83.
25. Brustovetsky, N., et al., *Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition*. *J Neurosci*, 2003. **23**(12): p. 4858-67.
26. Buchwald, A., et al., *Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy*. *Eur Heart J*, 1990. **11**(6): p. 509-16.
27. Bungler, R., R.T. Mallet, and D.A. Hartman, *Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure*. *Eur J Biochem*, 1989. **180**(1): p. 221-33.
28. Burlacu, A., *Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins*. *J Cell Mol Med*, 2003. **7**(3): p. 249-57.
29. Castedo, M., et al., *Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis*. *J Immunol*, 1996. **157**(2): p. 512-21.
30. Cavallini, L., M. Valente, and M.P. Rigobello, *The protective action of pyruvate on recovery of ischemic rat heart: comparison with other oxidizable substrates*. *J Mol Cell Cardiol*, 1990. **22**(2): p. 143-54.
31. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(3): p. 527-605.
32. Chauvin, C., et al., *Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(44): p. 41394-8.
33. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
34. Chien, K.R., *Stress pathways and heart failure*. *Cell*, 1999. **98**(5): p. 555-8.
35. Ciminelli, M., et al., *Short term training attenuates opening of the mitochondrial permeability transition pore without affecting myocardial function following ischemia-reperfusion*. *Mol Cell Biochem*, 2006. **291**(1-2): p. 39-47.
36. Clarke, S.J., G.P. McStay, and A.P. Halestrap, *Saquinavir 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*, 2002. **277**(38): p. 34793-9.

37. Cleeter, M.W., et al., *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases.* FEBS Lett, 1994. **345**(1): p. 50-4.
38. Clerk, A., et al., *Regulation of cardiac myocyte cell death.* Pharmacol Ther, 2003. **97**(3): p. 223-61.
39. Cohen, G.M., *Caspases: the executioners of apoptosis.* Biochem J, 1997. **326** ( Pt 1): p. 1-16.
40. Coleman, M.L., et al., *Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 339-45.
41. Connern, C.P. and A.P. Halestrap, *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, 1994. **302** ( Pt 2): p. 321-4.
42. Cory, S. and J.M. Adams, *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 647-56.
43. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.* Biochem J, 1999. **341** ( Pt 2): p. 233-49.
44. Crompton, M., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death.* J Physiol, 2000. **529** Pt 1: p. 11-21.
45. Crompton, M. and L. Andreeva, *On the involvement of a mitochondrial pore in reperfusion injury.* Basic Res Cardiol, 1993. **88**(5): p. 513-23.
46. Crompton, M. and A. Costi, *Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca<sup>2+</sup>, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca<sup>2+</sup> overload.* Eur J Biochem, 1988. **178**(2): p. 489-501.
47. Crompton, M. and A. Costi, *A heart mitochondrial Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states.* Biochem J, 1990. **266**(1): p. 33-9.
48. Crompton, M., H. Ellinger, and A. Costi, *Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress.* Biochem J, 1988. **255**(1): p. 357-60.
49. Crompton, M., et al., *The mitochondrial permeability transition pore.* Biochem Soc Symp, 1999. **66**: p. 167-79.
50. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points.* Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
51. Dart, C.H., Jr. and J.O. Holloszy, *Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization.* Circ Res, 1969. **25**(3): p. 245-53.
52. Debatin, K.M. and P.H. Krammer, *Death receptors in chemotherapy and cancer.* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2950-66.
53. DeBoer, L.W., et al., *Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation.* Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 2): p. H1571-6.
54. Deschepper, C.F., et al., *Characterization of myocardium, isolated cardiomyocytes, and blood pressure in WKHA and WKY rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(1): p. H149-55.
55. Detaille, D., et al., *Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process.* Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2179-87.
56. Dhalla, A.K., M.F. Hill, and P.K. Singal, *Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure.* J Am Coll Cardiol, 1996. **28**(2): p. 506-14.

57. Di Lisa, F., *Mitochondrial contribution in the progression of cardiac ischemic injury*. IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 255-61.
58. Di Lisa, F., et al., *Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2571-5.
59. Duchen, M.R., et al., *On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(10): p. 1790-4.
60. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
61. Eliseev, R.A., et al., *Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition*. Neurobiol Aging, 2007. **28**(10): p. 1532-42.
62. Elsasser, A., K. Suzuki, and J. Schaper, *Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(5): p. 711-24.
63. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
64. Eriksson, O., P. Pollesello, and N.E. Saris, *Inhibition of lipid peroxidation in isolated rat liver mitochondria by the general anaesthetic propofol*. Biochem Pharmacol, 1992. **44**(2): p. 391-3.
65. Fadok, V.A., et al., *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 551-62.
66. Fadok, V.A., et al., *CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3)*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6250-7.
67. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 45-79.
68. Gaasch, W.H., et al., *Tolerance of the hypertrophic heart to ischemia. Studies in compensated and failing dog hearts with pressure overload hypertrophy*. Circulation, 1990. **81**(5): p. 1644-53.
69. Gill, C., R. Mestral, and A. Samali, *Losing heart: the role of apoptosis in heart disease--a novel therapeutic target?* Faseb J, 2002. **16**(2): p. 135-46.
70. Gincel, D., H. Zaid, and V. Shoshan-Barmatz, *Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function*. Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 147-55.
71. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
72. Grace, A.A., et al., *Regulation of intracellular pH in the perfused heart by external HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Na<sup>(+)</sup>-H<sup>+</sup> exchange*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 2): p. H289-98.
73. Green, D.R. and J.C. Reed, *Mitochondria and apoptosis*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1309-12.
74. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(12): p. 1461-9.
75. Griffiths, E.J. and A.P. Halestrap, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **307** ( Pt 1): p. 93-8.

76. Griffiths, G.J., et al., *Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis*. J Cell Biol, 1999. **144**(5): p. 903-14.
77. Grutter, M.G., *Caspases: key players in programmed cell death*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(6): p. 649-55.
78. Guarnieri, C., C. Muscari, and C.M. Caldarera, *Oxygen radicals and tissue damage in heart hypertrophy*. Adv Myocardiol, 1985. **5**: p. 191-9.
79. Gulbins, E., S. Dreschers, and J. Bock, *Role of mitochondria in apoptosis*. Exp Physiol, 2003. **88**(1): p. 85-90.
80. Halestrap, A., *Biochemistry: a pore way to die*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 578-9.
81. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
82. Halestrap, A.P. and A.M. Davidson, *Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase*. Biochem J, 1990. **268**(1): p. 153-60.
83. HaS, F., *The Growing Burden of Heart Disease and Stroke in Canada 2003*. 2003: p. 1-74.
84. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
85. Hausenloy, D.J., et al., *Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H841-9.
86. Haworth, R.A. and D.R. Hunter, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 460-7.
87. Hein, S., et al., *Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 984-91.
88. Hengartner, M.O., *Apoptosis. DNA destroyers*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 27, 29.
89. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 291-300.
90. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2414-20.
91. Hoerter, J.A., et al., *Sustained function of normoxic hearts depleted in ATP and phosphocreatine: a 31P-NMR study*. Am J Physiol, 1988. **255**(2 Pt 1): p. C192-201.
92. Holmes, J.W., *Candidate mechanical stimuli for hypertrophy during volume overload*. J Appl Physiol, 2004. **97**(4): p. 1453-60.
93. Hopkins, J.C., et al., *Accumulation of 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate as a measure of glucose uptake in the isolated perfused heart: a 31P NMR study*. Metab Eng, 2004. **6**(1): p. 36-43.
94. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 453-9.



95. Hunter, D.R. and R.A. Haworth, *The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release*. Arch Biochem Biophys, 1979. **195**(2): p. 468-77.
96. Ide, T., et al., *Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction*. Circ Res, 2001. **88**(5): p. 529-35.
97. Ide, T., et al., *Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium*. Circ Res, 1999. **85**(4): p. 357-63.
98. Jarreta, D., et al., *Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 860-5.
99. Javadov, S., et al., *NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **38**(1): p. 135-43.
100. Javadov, S.A., et al., *Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 2): p. 513-24.
101. Javadov, S.A., et al., *Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 360-9.
102. Kang, P.M., et al., *Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H72-80.
103. Kantor, P.F., J.R. Dyck, and G.D. Lopaschuk, *Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart*. Am J Med Sci, 1999. **318**(1): p. 3-14.
104. Katz, A.M., *Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload*. Cardiovasc Drugs Ther, 2002. **16**(3): p. 245-9.
105. Kerr, P.M., M.S. Suleiman, and A.P. Halestrap, *Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 2): p. H496-502.
106. Kobayashi, A., et al., *Effects of verapamil on experimental cardiomyopathy in the Bio 14.6 Syrian hamster*. J Am Coll Cardiol, 1987. **10**(5): p. 1128-38.
107. Kokoszka, J.E., et al., *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore*. Nature, 2004. **427**(6973): p. 461-5.
108. Kostin, S., et al., *Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 715-24.
109. Kostuk, W.J., *Congestive heart failure: what can we offer our patients?* Cmaj, 2001. **165**(8): p. 1053-5.
110. Kristian, T., P. Bernardi, and B.K. Siesjo, *Acidosis promotes the permeability transition in energized mitochondria: implications for reperfusion injury*. J Neurotrauma, 2001. **18**(10): p. 1059-74.
111. Leichtweis, S.B., et al., *Ischaemia-reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart*. Acta Physiol Scand, 1996. **156**(1): p. 51-60.
112. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
113. Li, J.M., et al., *Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 477-84.

114. Li, Y.Y., et al., *Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity.* Circulation, 2001. **104**(20): p. 2492-7.
115. Li, Y.Y., et al., *Point mutations in mitochondrial DNA of patients with dilated cardiomyopathy.* J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(10): p. 2699-709.
116. Lindenmayer, G.E., L.A. Sordahl, and A. Schwartz, *Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure.* Circ Res, 1968. **23**(3): p. 439-50.
117. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c.* Cell, 1996. **86**(1): p. 147-57.
118. Long, X., et al., *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> flux and respiratory enzyme activity decline are early events in cardiomyocyte response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(1): p. 63-70.
119. Mackenzie, S. and L. McIntosh, *Higher plant mitochondria.* Plant Cell, 1999. **11**(4): p. 571-86.
120. Marin-Garcia, J. and M.J. Goldenthal, *Understanding the impact of mitochondrial defects in cardiovascular disease: a review.* J Card Fail, 2002. **8**(5): p. 347-61.
121. Marin-Garcia, J., et al., *Is age a contributory factor of mitochondrial bioenergetic decline and DNA defects in idiopathic dilated cardiomyopathy?* Cardiovasc Pathol, 1999. **8**(4): p. 217-22.
122. Marin-Garcia, J., et al., *A point mutation in the cytb gene of cardiac mtDNA associated with complex III deficiency in ischemic cardiomyopathy.* Biochem Mol Biol Int, 1996. **40**(3): p. 487-95.
123. Marshman, E., et al., *Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine.* J Pathol, 2001. **195**(3): p. 285-92.
124. Martin, S.J., et al., *Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity.* J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28753-6.
125. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.* J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1545-56.
126. Mayer, B. and R. Oberbauer, *Mitochondrial regulation of apoptosis.* News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 89-94.
127. Mazat, J.P., et al., *Metabolic control analysis and threshold effect in oxidative phosphorylation: implications for mitochondrial pathologies.* Mol Cell Biochem, 1997. **174**(1-2): p. 143-8.
128. Miramar, M.D., et al., *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor.* J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16391-8.
129. Moe, G.W., et al., *In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1813-20.
130. Moe, G.W., et al., *Early and persistent activation of myocardial apoptosis, bax and caspases: insights into mechanisms of progression of heart failure.* Pathophysiology, 2002. **8**(3): p. 183-192.
131. Murphy, P.G., et al., *The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol).* Br J Anaesth, 1992. **68**(6): p. 613-8.
132. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.

133. Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 12-8.
134. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 652-8.
135. Narula, J., et al., *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, 1999. **96**(14): p. 8144-9.
136. Nieminen, A.L., et al., *Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide*. Biochem J, 1995. **307** ( Pt 1): p. 99-106.
137. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
138. Opferman, J.T. and S.J. Korsmeyer, *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 410-5.
139. Ozcan, C., et al., *Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(9): p. 1161-6.
140. Rapizzi, E., et al., *Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria*. J Cell Biol, 2002. **159**(4): p. 613-24.
141. Rathmell, J.C. and C.B. Thompson, *The central effectors of cell death in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 781-828.
142. Roth, K.A., *Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion*. J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(9): p. 829-38.
143. Ruiz, F., et al., *Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity*. Eur J Pharmacol, 2000. **404**(1-2): p. 29-39.
144. Sabbah, H.N., et al., *Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(11): p. 1333-47.
145. Sabbah, H.N., V.G. Sharov, and S. Goldstein, *Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure*. Heart Fail Rev, 2000. **5**(2): p. 131-8.
146. Saeedi, R., et al., *Trimetazidine normalizes postischemic function of hypertrophied rat hearts*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **314**(1): p. 446-54.
147. Saeedi, R., et al., *Gender and post-ischemic recovery of hypertrophied rat hearts*. BMC Cardiovasc Disord, 2006. **6**: p. 8.
148. Sambandam, N., et al., *Energy metabolism in the hypertrophied heart*. Heart Fail Rev, 2002. **7**(2): p. 161-73.
149. Saraste, A., et al., *Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(5): p. 380-6.
150. Scheubel, R.J., et al., *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, 2002. **39**(3): p. 481-8.
151. Scheubel, R.J., et al., *Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(12): p. 2174-81.
152. Schinzel, A.C., et al., *Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12005-10.
153. Schultheiss, H.P. and M. Klingenberg, *Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity*. Eur J Biochem, 1984. **143**(3): p. 599-605.

154. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2361-7.
155. Shi, Y., *Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 459-70.
156. Skalka, M., J. Matyasova, and M. Cejkova, *Dna in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments*. FEBS Lett, 1976. **72**(2): p. 271-4.
157. Sordahl, L.A., et al., *Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure*. Am J Physiol, 1973. **224**(3): p. 497-502.
158. Souzeau, E., et al., *A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats*. Hypertension, 2006. **47**(1): p. 128-33.
159. Stanley, W.C. and C.L. Hoppel, *Mitochondrial dysfunction in heart failure: potential for therapeutic interventions?* Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 805-6.
160. Stoner, C.D., M.M. Ressallat, and H.D. Sirak, *Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts*. Circ Res, 1968. **23**(1): p. 87-97.
161. Suleiman, M.S., A.P. Halestrap, and E.J. Griffiths, *Mitochondria: a target for myocardial protection*. Pharmacol Ther, 2001. **89**(1): p. 29-46.
162. Swynghedauw, B. and C. Delcayre, *Biology of cardiac overload*. Pathobiol Annu, 1982. **12**: p. 137-83.
163. Szabo, I., P. Bernardi, and M. Zoratti, *Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons*. J Biol Chem, 1992. **267**(5): p. 2940-6.
164. Thoenes, M., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase in failing and non-failing human heart*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(1): p. 165-9.
165. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death*. Apoptosis, 2006.
166. Tsutsui, H., *Mitochondrial oxidative stress and heart failure*. Intern Med, 2006. **45**(13): p. 809-13.
167. van der Klei, I.J., M. Veenhuis, and W. Neupert, *A morphological view on mitochondrial protein targeting*. Microsc Res Tech, 1994. **27**(4): p. 284-93.
168. Vandenberg, J.I., J.C. Metcalfe, and A.A. Grace, *Intracellular pH recovery during respiratory acidosis in perfused hearts*. Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 1): p. C489-97.
169. Vaux, D.L. and A. Strasser, *The molecular biology of apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2239-44.
170. Waldmeier, P.C., et al., *Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(1): p. 22-9.
171. Whipps, D.E. and A.P. Halestrap, *Rat liver mitochondria prepared in mannitol media demonstrate increased mitochondrial volumes compared with mitochondria prepared in sucrose media. Relationship to the effect of glucagon on mitochondrial function*. Biochem J, 1984. **221**(1): p. 147-52.
172. Wyllie, A.H., *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation*. Nature, 1980. **284**(5756): p. 555-6.
173. Wyllie, A.H., et al., *Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis*. J Pathol, 1984. **142**(1): p. 67-77.
174. Yano, M., Y. Ikeda, and M. Matsuzaki, *Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 556-64.

175. Zoratti, M. and I. Szabo, *The mitochondrial permeability transition*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(2): p. 139-76.
176. Zoratti, M., I. Szabo, and U. De Marchi, *Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house?* Biochim Biophys Acta, 2005. **1706**(1-2): p. 40-52.

# ANNEXE



## Original article

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

Mariannick Marcil<sup>a</sup>, Alexis Ascah<sup>a</sup>, Jimmy Matas<sup>a</sup>, Sonia Bélanger<sup>b</sup>,  
Christian F. Deschepper<sup>b</sup>, Yan Burelle<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Département de kinésiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

<sup>b</sup> Experimental Cardiovascular Biology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Received 22 June 2006; received in revised form 9 August 2006; accepted 28 August 2006  
Available online 24 October 2006

## Abstract

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

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Hypertrophy; Mitochondria; Oxidative phosphorylation; Hypoxia/anoxia; Heart failure

## 1. Introduction

Hypertrophic ventricular remodeling is a response of the heart to numerous forms of cardiac stresses, including increases in workload, loss of contractile mass from prior infarction and/or neuroendocrine activation [1]. It is accompanied by a host of changes that take place at the level of cardiomyocytes (including alterations in Ca<sup>2+</sup> handling, sarcomere function, of several signaling pathways and energy metabolism) and the extracellular matrix [1–3]. However, some (if not most) of these changes appear to be maladaptive as left ventricular hyper-

trophy associates with increased mortality and morbidity [4,5] and may often progress towards systolic heart failure [1].

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

\* Corresponding author. Tel.: [information retirée / information withdrawn]

E-mail address: [information retirée / information withdrawn] (Y. Burelle).

end-stage failure, which led to the suggestion that mitochondrial dysfunction represents a late phenomenon in the disease process [12].

In contrast, very little information is available on whether or not the ability of mitochondria to tolerate stress is altered in hearts undergoing pathological ventricular remodeling. This is of importance as left ventricular dysfunction, once established as a consequence of a primary event, can deteriorate progressively over a period of months or years before eventually culminating into the syndrome of congestive heart failure [13] and thus exposes the heart to prolonged periods of stress. Recently, it has been reported that mitochondria isolated from transgenic mice overexpressing TNF $\alpha$  in a cardiac-restricted fashion display a lower tolerance to oxidative stress and an increased susceptibility to permeability transition pore opening (PTP) [8], an event that is critically involved in mitochondria-mediated cell death [14–18]. However, the hearts of these animals already displayed severe systolic dysfunction, and their mitochondria displayed structural damage as well as a severely compromised oxidative capacity. The study therefore did not resolve the question of whether increased mitochondrial vulnerability to stress can be observed at earlier stages of the disease and whether it can precede the occurrence of overt mitochondrial defects.

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

## 2. Methods

### 2.1. Animal care

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

### 2.2. Induction of chronic volume overload and isolation of mitochondria

Induction of the aorto-caval fistula was performed at 10 weeks of age as described elsewhere [23]. For measurements of mitochondrial performance *in vitro*, animals were anesthetized

(ketamine/xylazine: 61.5/7.7 mg/kg, i.p.) 12 weeks after surgery, and the hearts were dissected out rapidly. Biventricular weight and the individual weight of the left (LV, plus septum) and right ventricles (RV) were determined. A small piece (100 mg) of the LV was immediately frozen in liquid nitrogen, and the remaining LV tissue was used for isolation of mitochondria. Each ACF animal was paired with one sham-operated control on the same day of experimentation.

Heart mitochondria were prepared as described previously [24]. Hearts were rapidly excised and immersed into ice-cold isolation medium (buffer A, in mM: 300 sucrose, 10 Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride (Tris–HCl), 1 Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic Acid (EGTA), pH 7.3) and weighed. Ventricular tissue was minced with scissors in 5 ml of buffer A supplemented with 0.2% fatty acid free bovine serum albumin (BSA) and homogenized using a Polytron tissue tearer (~3 s at a setting of 3). The homogenate was then incubated with the protease Nagarse (1.5 mg/g) for 5 min and further homogenized at the same settings. The homogenate volume was completed to 30 ml with Buffer A + 0.2% BSA and centrifuged at 800 $\times$ g for 10 min. The pellet was discarded and the supernatant was decanted and centrifuged at 10 000 $\times$ g for 10 min. The pellet obtained was re-suspended in buffer B (in mM: 300 sucrose, 0.5 EGTA, 10 Tris–HCl, pH 7.3) and centrifuged at 10,000 $\times$ 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 bicinchonic acid method (Pierce, Rockford, IL, USA), with bovine serum albumin as a standard.

### 2.3. Anoxia–reoxygenation *in vitro*

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



#### 2.4. Mitochondrial respiratory function

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

#### 2.5. Calcium challenge

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

#### 2.6. Enzymatic analyses

The measurements of the specific activity of the rotenone-sensitive NADH–ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate–ubiquinone reductase (complex II), rotenone-sensitive NADH–cytochrome *c* oxidoreductase (complex I+III), cytochrome *c* oxidase (complex IV) and citrate synthase (CS) were performed spectrophotometrically on left ventricular homogenates according to Jarreta et al. [10].

#### 2.7. Isolated heart perfusion

Hearts were rapidly excised and immersed in ice-cold Henseleit (KH) buffer (in mM: NaCl 119, KCl 4.8,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$ , 24  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.8, glucose 11, pH 7.4). The aorta was cannulated, and the coronary arteries perfused with KH buffer in the Langendorff mode at a constant pressure of 70 mm Hg. This pressure is recommended for heart perfusion with crystalline buffers in order to limit edema, which occurs when physiological perfusion pressures (90–100 mm Hg) are used [28]. In addition, an incision was made in the pulmonary artery to favor drainage of the coronary effluent. The perfusion

solution was oxygenated with 95%  $\text{O}_2$ –5%  $\text{CO}_2$  and maintained at 37°C throughout the perfusion. Hearts were maintained in a water-jacketed chamber maintained at 37°C and were not paced. Perfusion pressure was monitored by use of an in-line pressure transducer connected to an in-line data acquisition system (Powerlab 8/30, ADInstruments, Colorado Springs, CO). Ventricular pressure was monitored via a separate pressure transducer connected to a fluid-filled latex balloon inserted in the left ventricle via the left atrium. The size of the balloon was adjusted to take into account differences in the size of the left ventricular cavity and was inflated to provide an end-diastolic pressure of ~10 mm Hg. Hearts were submitted to a protocol consisting of 30 min of low-flow ischemia (3% of pre-ischemic flow delivered by means of a roller pump) followed by 40 min of reperfusion. Norepinephrine (100  $\mu\text{M}$ ) was infused by means of a syringe pump during the entire I–R protocol starting 5 min prior to ischemia in order to mimic the adrenergic stress encountered during I–R. In addition, norepinephrine induced significant damage and PTP opening and yet allowed to obtain a systematic recovery of measurable contractile function during reperfusion. Coronary effluent was collected at 10-min interval throughout the perfusion for measurements of coronary flow and determination of LDH release. LDH activity in the perfusate was measured spectrophotometrically on the same day using a method previously described [29], and LDH release was expressed in  $\text{mU min}^{-1} \text{g}^{-1}$  of wet tissue.

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

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

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

At the end of perfusion, hearts were removed, weighted and homogenized in 5 ml of ice-cold sucrose buffer (in mM: sucrose 300, Tris–HCl 10, EGTA 2, BSA 5 mg/ml, pH 7.4) with a polytron homogenizer (setting 3 for 5 s) and volume was then

completed to 40 ml. An aliquot of the crude homogenate was retained for measurements of [ $^3\text{H}$ ] DOG, and the remainder was immediately centrifuged at  $800\times g$  for 2 min to remove cellular debris. The supernatant was recovered and centrifuged at  $10,000\times g$  for 10 min. The mitochondrial pellet obtained was washed in 30 ml of sucrose buffer containing no BSA and centrifuged at  $10,000\times g$  for 10 min. The final mitochondrial pellet was re-suspended in 1.0 ml of sucrose buffer without BSA. 100 and 500  $\mu\text{l}$  of this mitochondrial suspension were retained for the measurement of citrate synthase (CS) activity and determination of [ $^3\text{H}$ ] DOG, respectively, while the remainder was used for respirometry experiments as described above. In all buffers, a high concentration of EGTA was used in order to favor rapid PTP closure and entrapment of [ $^3\text{H}$ ] DOG [30]. For the measurement of [ $^3\text{H}$ ] DOG, crude homogenate and mitochondrial samples were mixed with an equal volume of 5% (w/v) perchloric acid and centrifuged at  $10,000\times g$  for 2 min. Radioactivity of the supernatant (500  $\mu\text{l}$  samples) was counted in 10 ml of scintillant.

### 2.9. Mitochondrial [ $^3\text{H}$ ] DOG entrapment

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

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

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

### 2.10. Statistical analyses

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

## 3. Results

### 3.1. Effect of ACF on morphological parameters and mitochondrial yield

As shown in Table 1, 12 weeks of volume overload induced an important biventricular hypertrophy expressed both in absolute values and relative to tibial length, consistent with results previously obtained using this model [22,33]. Lung

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

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

Values are means  $\pm$  SEM for 12 animals in each group.

<sup>a</sup> Significantly different from sham ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Significantly different from sham ( $p < 0.01$ ).

weight was significantly higher in ACF vs sham ( $p < 0.01$ ), but no difference was observed in the liver weight, no animal displayed ascites and no lethality was observed over the course of the study.

### 3.2. Respiratory chain enzymology, baseline respiratory function and membrane potential

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

### 3.3. Response to anoxia–reoxygenation *in vitro*

Fig. 2 shows the results of experiments in which mitochondria were submitted to *in vitro* anoxia–reoxygenation. In mitochondria from sham animals,  $V_{\text{ADP}}$  measured at 10 and 20 min of reoxygenation was respectively decreased to 64  $\pm$  4% and 54  $\pm$  4% of baseline values measured in the absence of stress (Fig. 2B). This inhibition of maximal ADP-stimulated respiration was accompanied by a significant reduction in RCR values (Fig. 2C). In contrast, the same treatment induced significantly more damage in mitochondria from ACF animals. Indeed,  $V_{\text{ADP}}$  was reduced to 51  $\pm$  3 and 30  $\pm$  3% of baseline value at 10 and

Table 2  
Activity of mitochondrial enzymes in sham and ACF rats

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

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

20 min of reoxygenation, respectively, and RCR values were significantly lower compared to that observed in mitochondria from sham animals.

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

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

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

### 3.4. Susceptibility to $Ca^{2+}$ -induced PTP opening

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

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

### 3.5. Response to ischemia–reperfusion

In order to determine whether this mitochondrial vulnerability to stress also occurred in the whole organ and was associated with greater dysfunction and injury, isolated hearts

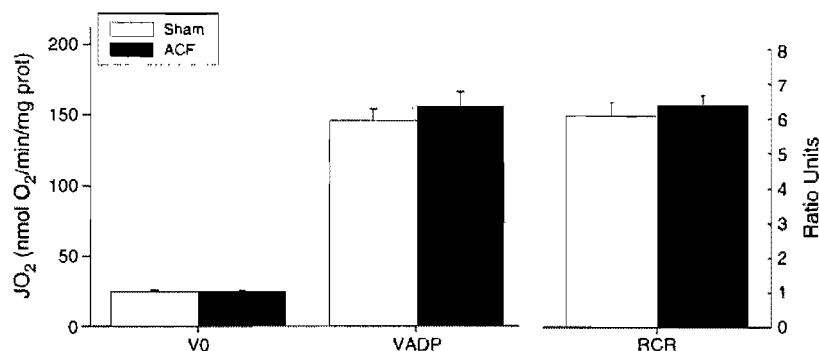


Fig. 1. Effect of ACF on baseline mitochondrial respiration. Basal ( $V_0$ ), ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) and respiratory control ratio (RCR:  $V_{ADP}/V_0$ ) of mitochondria energized with glutamate–malate (5:2.5 mM). Values are reported as mean values±SEM for  $n=12$  in each group.

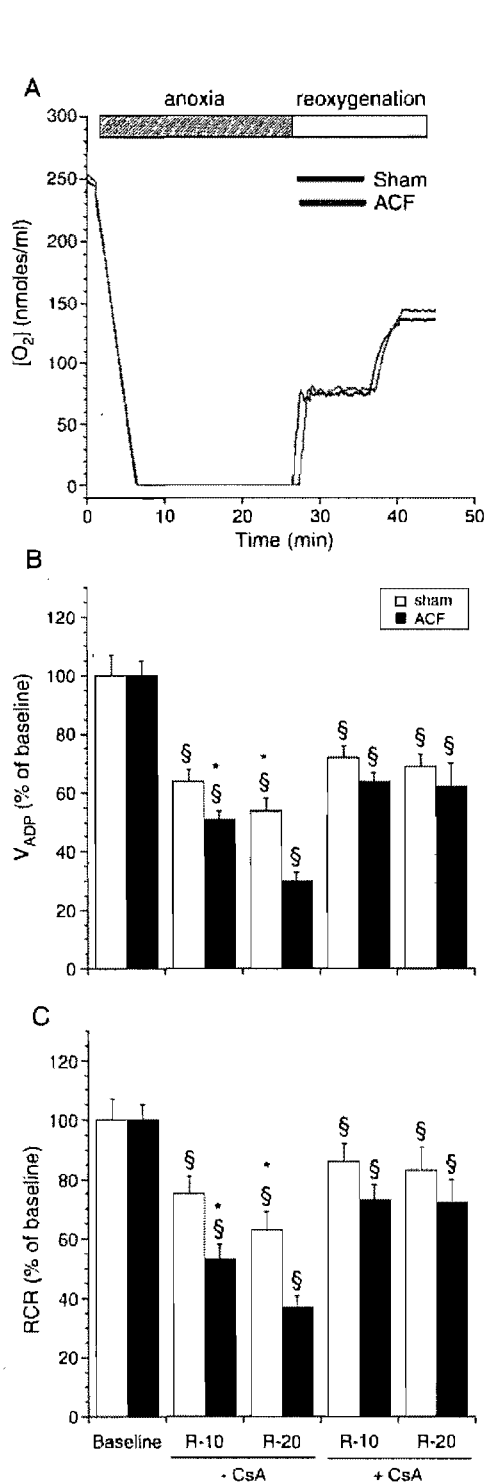


Fig. 2. Effect of ACF on susceptibility to anoxia-reoxygenation injury. Panel A shows a typical recording of oxygen concentration during anoxia-reoxygenation in mitochondria from sham and ACF animals. Values of ADP-stimulated ( $V_{ADP}$ ) respiration and RCR measured at baseline and after 10 and 20 min of reoxygenation are shown in panels B and C. Experiments were performed in the absence or presence of 1  $\mu$ M cyclosporin A (CsA) added before anoxia. Values are reported as mean values  $\pm$  SEM for  $n=12$  in each group. §: significantly different from pre-anoxia within the same experimental group,  $p<0.01$ , \*: significantly different from sham in the same experimental condition,  $p<0.01$ .

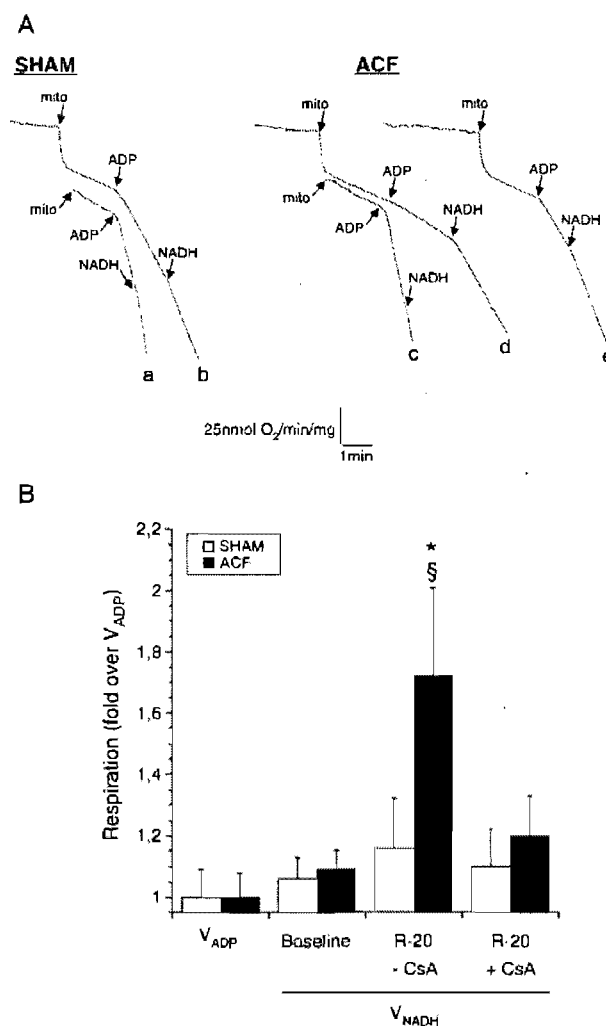


Fig. 3. Effect of NADH on respiration in mitochondria from sham and ACF animals at 20 min of reoxygenation following anoxia. Panel A shows the slopes of original respirometry tracings after subsequent addition of mitochondria ( $V_0$ ), 1 mM ADP ( $V_{ADP}$ ) and 4 mM NADH ( $V_{NADH}$ ) in mitochondria from sham and ACF animals at baseline in the absence of anoxia-reoxygenation (line a and c) and after 20 min of reoxygenation in the absence of 1  $\mu$ M cyclosporin A (CsA) (line b and d). Typical tracing obtained in ACF animals following reoxygenation in the presence of CsA is also shown (line e). Panel B represents the average effect of NADH supplementation on respiration in both experimental groups (mean  $\pm$  SEM,  $n=6$  separate preparations) at baseline in the absence of stress and following 20 min of reoxygenation in the absence or presence of (CsA). In mitochondria from ACF animals, anoxia-reoxygenation resulted in a more pronounced reduction in the stimulatory effect of ADP on respiration compared to sham (A, line d vs line b). In mitochondria from sham animals, addition of NADH to mitochondria had only small effects on respiration in all experimental conditions (B). In contrast, in mitochondria from ACF animals, addition of NADH resulted in a significant increase in respiration following anoxia-reoxygenation, and this effect was abolished in the presence of CsA (B). In addition, in the ACF group, the presence of CsA allowed to increase  $V_{ADP}$  to the level observed in the sham group (A, line e vs line b). §: significantly different from -CsA within the same experimental group,  $p<0.05$ , \*: significantly different from sham,  $p<0.05$ .

were submitted to ischemia-reperfusion in the presence of adrenergic stress and pore opening was assessed *in situ* using the mitochondrial entrapment of [ $^3$ H] DOG. Fig. 5 shows the

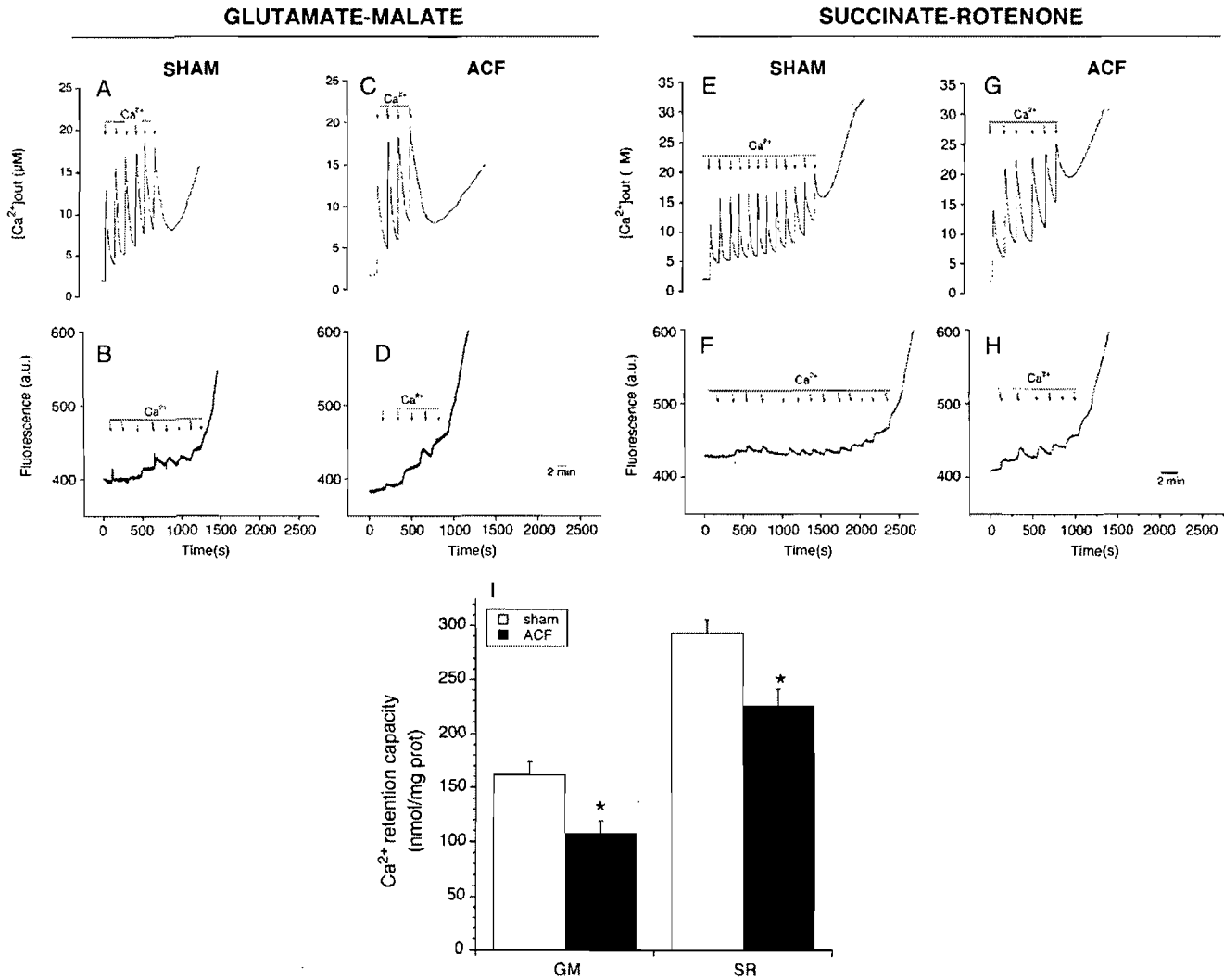


Fig. 4. Effect of ACF on the sensitivity to  $Ca^{2+}$ -induced PTP opening. Typical  $Ca^{2+}$  kinetics (A, C, E and G) and membrane potential (B, D, F and H) tracings of sham and ACF mitochondria energized with glutamate-malate (5:2.5 mM) (A–D) or succinate (5 mM) in the presence of 1 μM rotenone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

evolution of heart rate, left ventricular developed pressure, diastolic pressure and coronary flow throughout the perfusion protocol. Prior to ischemia, no significant difference was observed between the two experimental groups in any contractile parameters. However, during reperfusion following 30 min of severe low-flow ischemia, the recovery of contractile function was significantly impaired in hearts from ACF animals as indicated by lower values of LVDP, a significantly greater rise in diastolic pressure and altered rates of force development and relaxation (data not shown). In contrast, coronary flow per gram of tissue was similar in both experimental groups during reperfusion indicating that the impairment of functional recovery in ACF hearts was not related to a lower coronary flow. The release of LDH in the coronary effluent was low and similar in both experimental groups prior to ischemia ( $35 \pm 7$  mU  $min^{-1} g^{-1}$  wet weight,

pooled average  $n = 17$ ). However, the amount of LDH released over the reperfusion period was 2-fold higher in hearts from ACF animals, (Fig. 6A), indicating an exacerbated loss of sarcolemmal integrity compared to sham.

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

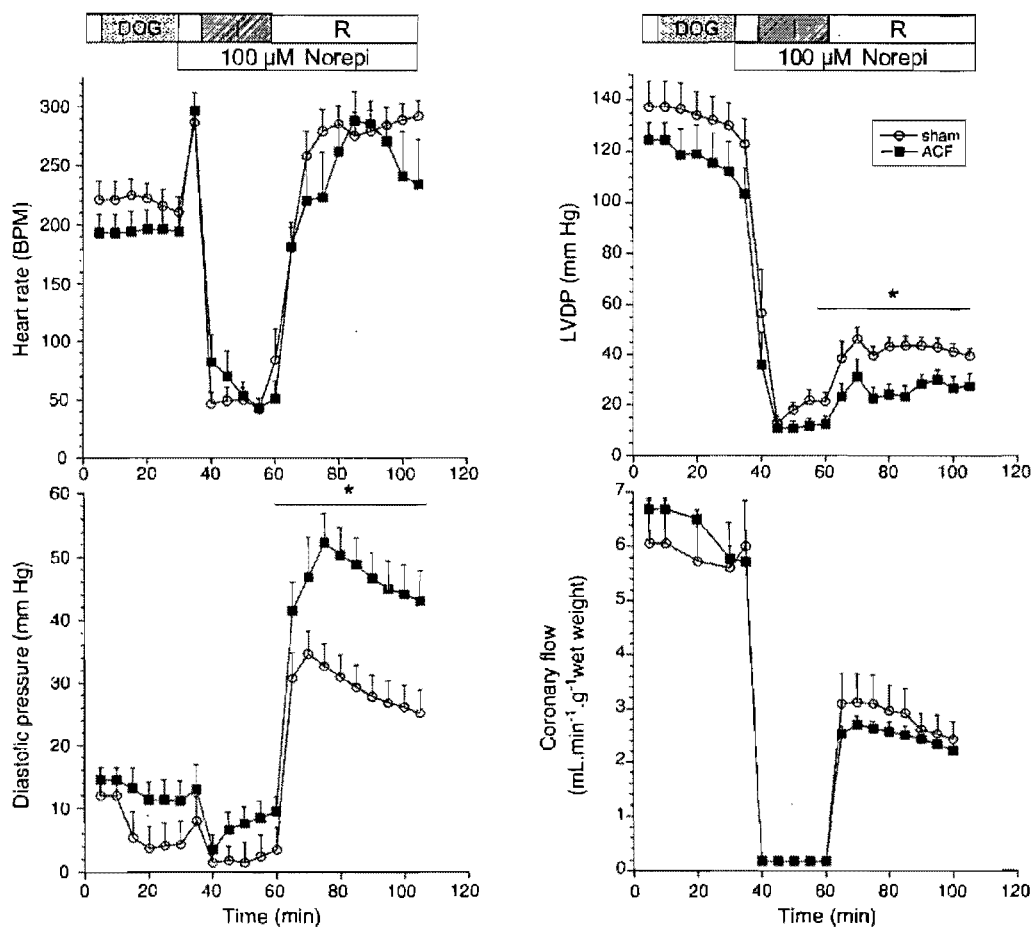


Fig. 5. Myocardial response to ischemia–reperfusion in sham and ACF animals. The figure shows the evolution of heart rate, left ventricular developed pressure (LVDP), diastolic pressure and coronary flow in sham and ACF hearts submitted to low-flow ischemia in the presence of adrenergic stress. For sake of clarity, the values obtained in hearts that were not submitted to I–R ( $n=4$  in each group) and were used for measurements of baseline [ $^3\text{H}$ ] DOG are not shown. Following the initial 10-min period of stabilization, hearts were perfused with KH buffer containing [ $^3\text{H}$ ] DOG as indicated. Perfusion was switched back to normal KH buffer for 5 min prior to ischemia in order to wash out extracellular [ $^3\text{H}$ ] DOG. During washout, the infusion of norepinephrine ( $100\ \mu\text{M}$ ) was started and maintained during I–R. LVDP was calculated as the difference between systolic and diastolic pressure. \*: Significantly different from sham,  $p < 0.05$ .

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

#### 4. Discussion

Although mitochondrial dysfunction has often been associated with heart failure, it has been suggested that it may represent only a late phenomenon in the disease process. In the

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

##### 4.1. Tissue oxidative capacity and baseline mitochondrial function

There are several reports in the literature concerning the impact of pathological cardiac remodeling on mitochondrial function and in particular on their capacity for ATP production.

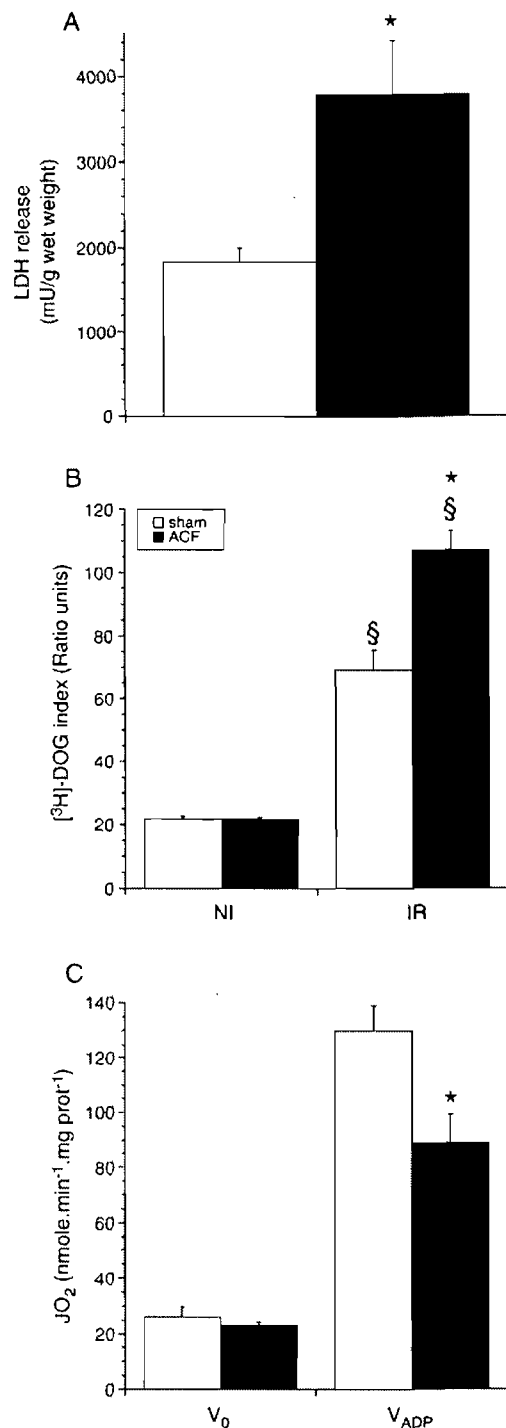


Fig. 6. LDH release, mitochondrial [<sup>3</sup>H] DOG entrapment and respiratory function post-reperfusion in sham and ACF animals. Panel A shows the area under the curve of LDH release in the perfusate during reperfusion. LDH release was calculated by multiplying time-matched values of coronary flow (in ml min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> wet weight) and LDH concentration measured in the perfusate (in mU min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> wet weight). Panel B shows the [<sup>3</sup>H] DOG index expressed at the ratio mitochondrial dpm/tissue dpm (see Methods for further details) in non-ischemic hearts (NI; *n*=4 in each group) and hearts submitted to I-R (IR; *n*=9 and 8 for sham and ACF respectively). Panel C shows values obtained for basal ADP-restricted (*V*<sub>0</sub>) and maximal ADP-stimulated (*V*<sub>ADP</sub>) respiration measured in mitochondria isolated at the end of reperfusion.

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

The results reported in the present study are consistent with these observations since the activities of the respiratory chain complexes I, II, I+III, and IV were similar in LV tissue from sham and ACF animals (Table 2). Moreover, characterization of mitochondrial function under baseline unstressed conditions indicated no change in ADP-restricted and maximal ADP-stimulated respiration, membrane potential as well as the coupling of oxidation to phosphorylation (Fig. 1).

#### 4.2. Mitochondrial vulnerability to anoxia–reoxygenation *in vitro*

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

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

In the present study, we observed that during anoxia–reoxygenation the presence of the PTP inhibitor CsA abolished the difference in *V*<sub>ADP</sub> and RCR observed between mitochondria from sham and ACF animals at 10 and 20 min of reoxygenation (Fig. 2). In addition, supplementation of exogenous NADH to compensate for the loss of endogenous pyridine nucleotides that occurs following PTP opening [35] significantly increased respiration only in ACF animals and this was abolished by CsA (Fig. 3). Altogether, these data suggest that the occurrence of pore opening was an important factor

responsible for the greater respiratory dysfunction observed in mitochondria from ACF compared to sham animals in response to anoxia–reoxygenation.

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

#### 4.3. Susceptibility to $Ca^{2+}$ -induced PTP opening

Ozcan et al. [8] reported that, in mitochondria obtained from the failing hearts of TNF $\alpha$  transgenic mice and energized with substrates for complex I, the sensitivity to PTP opening in response to  $Ca^{2+}$  was increased by  $\sim 40\%$ . In the present study, the  $\sim 50\%$  reduction in the amount of  $Ca^{2+}$  required to trigger pore opening in mitochondria from ACF animals in the presence of glutamate–malate confirms and extends these data by showing that an increased vulnerability to PTP opening can be observed in mitochondria from non-failing hearts in the absence of any apparent mitochondrial dysfunction at baseline under stress-free conditions. This observation is also compatible with our data showing that pore opening appeared to explain the difference in respiratory function following anoxia–reoxygenation. Of note,  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition is known to be modulated by a variety of physiological effectors (see [36] for review), including the flow of electrons through complex I, which increases the sensitivity of PTP to  $Ca^{2+}$ -induced opening [24,35]. However, in the present study, bypassing complex I using succinate did not abolish the difference in CRC between both experimental groups, suggesting that the greater sensitivity of ACF mitochondria to pore opening was not related to a mechanism involving electron flow through complex I.

#### 4.4. Response to ischemia–reperfusion

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

*ex vivo* under normal perfusion conditions (Fig. 5). This would be consistent with the fact that in the study by Javadov et al. [25] no change in baseline mitochondrial [ $^3H$ ] DOG entrapment was observed 8 and 12 weeks post-infarction at a time when mitochondrial function was normal and no signs of decompensation were apparent.

Our study moreover reveals that mitochondrial [ $^3H$ ] DOG entrapment was substantially greater in hearts from ACF compared to sham animals following ischemia–reperfusion. Additionally, in line with the results obtained in our *in vitro* experiments, mitochondria from ACF animals isolated following reperfusion displayed lower values of  $V_{ADP}$  and RCR compared to sham. Our results thus indicate that, prior to the overt mitochondrial defects inherent to failure, mitochondria clearly show an increased vulnerability to PTP opening and dysfunction when the heart is submitted to stress. Given that the extent of pore opening was previously found to have a significant impact of myocardial recovery during reperfusion [34,47], this could at least partly account for the poorer recovery of contractile function and the greater release of LDH during reperfusion in hearts from ACF animals.

## 5. Conclusion

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

## Acknowledgments

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

## References

- [1] Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2005;289:H8–16.



- [2] Katz AM. Maladaptive growth in the failing heart: the cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:245–9.
- [3] Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003;65:45–79.
- [4] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990;322:1561–6.
- [5] Benjamin EJ, Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci* 1999;317:168–75.
- [6] Li YY, Chen D, Watkins SC, Feldman AM. Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 2001;104:2492–7.
- [7] Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2361.
- [8] Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL, Terzic A. Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:1161–6.
- [9] Sabbah HN, Sharov V, Riddle JM, Kono T, Lesch M, Goldstein S. Mitochondrial abnormalities in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:1333–47.
- [10] Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, et al. Mitochondrial function in heart muscle from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2000;45:860–5.
- [11] Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001;88:529–35.
- [12] van Bilsen M, Smeets PJH, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res* 2004;218:61.
- [13] Sabbah HN, Sharov VG, Goldstein S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5:131.
- [14] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;341:233–49.
- [15] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005;434:658.
- [16] Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 2000;28:170–7.
- [17] Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434: 652–658.
- [18] Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:12005–10.
- [19] Holmes JW. Candidate mechanical stimuli for hypertrophy during volume overload. *J Appl Physiol* 2004;97:1453–60.
- [20] Ashikaga H, Covell JW, Omens JH. Diastolic dysfunction in volume-overload hypertrophy is associated with abnormal shearing of myolaminar sheets. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2005;288:H2603–10.
- [21] Brower GL, Janicki JS. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2001; 280:H674–83.
- [22] Souzeau E, Llamas B, Belanger S, Picard S, Deschepper CF. A genetic locus accentuates the effect of volume overload on adverse left ventricular remodeling in male and female rats. *Hypertension* 2006;47: 128–33.
- [23] Garcia R, Diebold S. Simple, rapid, and effective method of producing aortic shunts in the rat. *Cardiovasc Res* 1990;24:430–2.
- [24] Marcil M, Bourduas K, Ascah A, Burelle Y. Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2006;290:H1549–57.
- [25] Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M. *Nhe-1* inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:135–43.
- [26] Ichas F, Jouaville LS, Mazat JP. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 1997;89:1145–53.
- [27] Ermaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 1986;850:436–48.
- [28] Döring HJ, Dehnert H. The isolated perfused heart. West Germany: Biomesstechnick-Verlag; 1988.
- [29] Burelle Y, Hochachka PW. Endurance training induces muscle-specific changes in mitochondrial function in skinned muscle fibers. *J Appl Physiol* 2002;92:2429–38.
- [30] Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995; 307:93–8.
- [31] Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol* 2003;549:513–24.
- [32] Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res* 2000;45:360–9.
- [33] Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J Appl Physiol* 2003;94:752–63.
- [34] DiLisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 2001; 276:2571–5.
- [35] Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 1998;273: 12662–8.
- [36] Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995;1241:139–76.
- [37] Halestrap AP, Connem CP, Griffiths EJ, Kerr PM. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997;174:167–72.
- [38] Dart Jr CH, Holloszy JO. Hypertrophied non-failing rat heart; partial biochemical characterization. *Circ Res* 1969;25:245–53.
- [39] Lindenmayer GE, Sordahl LA, Schwartz A. Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. *Circ Res* 1968;23:439–50.
- [40] Sobel BE, Spann Jr JF, Pool PE, Sonnenblick EH, Braunwald E. Normal oxidative phosphorylation in mitochondria from the failing heart. *Circ Res* 1967;21:355–64.
- [41] Sordahl LA, McCollum WB, Wood WG, Schwartz A. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am J Physiol* 1973;224:497–502.
- [42] Stoner CD, Ressallat MM, Sirak HD. Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts. *Circ Res* 1968;23:87–97.
- [43] Leichtweis SB, Leeuwenburgh C, Chandwaney R, Parmelee DJ, Ji LL. Ischaemia–reperfusion induced alterations of mitochondrial function in hypertrophied rat heart. *Acta Physiol Scand* 1996;156:51–60.
- [44] Swynghedauw B, Delcayre C. Biology of cardiac overload. *Pathobiol Annu* 1982;12:137–83.
- [45] Batandier C, Leverve X, Fontaine E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 2004;279:17197–204.
- [46] Lesnefsky EJ, Guduz TI, Moghaddas S, Migita CT, Ikeda-Saito M, Turkały PJ. Aging decreases electron transport complex iii activity in heart intermembrane mitochondria by alteration of the cytochrome c binding site. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:37–47.
- [47] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—A target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372–85.

- [48] Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* 2002;40:477–84.
- [49] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:500–8.
- [50] Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell* 1999;98:555–8.
- [51] Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:556–64.
- [52] Balke CW, Shorofsky SR. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1998;37:290–9.