



**HAL**  
open science

# Implication des fonctions mitochondriales dans l'effet cardioprotecteur induit par la sur-expression de la protéine H11 kinase/Hsp22 chez la souris

Romain Long

► **To cite this version:**

Romain Long. Implication des fonctions mitochondriales dans l'effet cardioprotecteur induit par la sur-expression de la protéine H11 kinase/Hsp22 chez la souris. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT: 2014PA114809 . tel-01167467

**HAL Id: tel-01167467**

**<https://theses.hal.science/tel-01167467>**

Submitted on 24 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®

# UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

## ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

*PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE*

## DISCIPLINE : Pharmacologie expérimentale et clinique

ANNÉE 2013 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1275

## THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 29/04/2014

par

**Romain LONG**

Implication des fonctions mitochondriales dans l'effet cardioprotecteur induit par la sur-expression de la protéine H11 kinase/Hsp22 chez la souris.

**Directeur de thèse :** M le Dr Didier MORIN

Directeur de recherche CNRS  
Université Paris-Est, Créteil.

### **Composition du jury :**

*Président du jury :* Mme le Pr Véronique LEBLAIS

Professeur  
UFR de Pharmacie de Paris-Sud,  
Châtenay-Malabry.

*Rapporteurs :* Mme le Dr Stéphanie BARRERE

Directeur de recherche INSERM  
Université Montpellier 1 & 2,  
Montpellier.

M le Dr Philippe DIOLEZ

Chargé de recherche CNRS  
Université Bordeaux Segalen,  
Bordeaux.

*Examineurs :* Mme le Dr Renée VENTURA-CLAPIER

Directeur de recherche CNRS  
UFR de Pharmacie de Paris-Sud,  
Châtenay-Malabry.

M le Pr Alain BERDEAUX

Professeur  
Université Paris-Est, Créteil.

*A Muriel, Trystan et Sasha*

*A mes parents, Muriel et Gilbert,*

*A ma sœur Chloé et mon frère Gautier.*

*A mes grands-parents Jeanine, Gilbert, Colette et Jean.*

# REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux personnes qui ont contribué à ces travaux :

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Didier Morin, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadré, m'avoir fait confiance, pour sa disponibilité, sa bienveillance et ses conseils, en espérant avoir été à la hauteur.

Je remercie également le Pr Alain Berdeaux pour m'avoir accueilli dans son équipe, guidé et conseillé tout au long de ce travail de thèse et plus généralement pour m'avoir fait découvrir et aimer la pharmacologie et la recherche.

Je remercie le Dr Christophe Dépré pour nous avoir confié son modèle de souris transgénique et accordé sa confiance.

Je remercie le Pr Stéphanie Barrère et le Pr Philippe Diolez pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Je remercie le Dr Renée Ventura-Clapier et le Pr Véronique Leblais qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie le Pr Catherine Marchand-Leroux pour avoir assisté à mon comité de thèse.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : le Pr Bijan Ghaleh pour ses conseils avisés et ses questions toujours pertinentes, le Dr Sandrine Pons pour sa disponibilité et tout ce qu'elle fait pour rendre le quotidien de l'équipe plus facile, le Dr Roland Zini pour sa profonde érudition sur la mitochondrie, Valérie Martin pour ses conseils techniques et l'apprentissage de la chirurgie cardiaque chez la souris, Sarah Kobeissi pour l'aide à la réalisation des RT PCR, le Dr Benjamin Haas pour ses conseils sur le dosage du glutathion et les western blot, le Dr Nathalie Mouraret pour son travail sur la sénescence



dans notre modèle et le Dr Lydie Laure qui a initié les travaux sur le modèle au laboratoire et qui m'a encadré pendant mes stages de master.

Mes remerciements vont également au Dr Lolita Portal, au Dr Stéphanie Paradis, à Nicolas Eychenne et à Sophie Jacquin pour les bons moments partagés sur des périodes plus ou moins longues lors de cette thèse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe 3 de l'unité INSERM U955 que j'ai croisé au cours de cette thèse, qu'ils travaillent à l'école vétérinaire de Maison-Alfort ou à la faculté de Médecine de Créteil.

<b>Glossaire</b> .....	7
<b>Liste des figures et tableaux</b> .....	11
<b>Introduction générale</b> .....	13
<b>PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	15
<b>Chapitre 1 : La mitochondrie</b> .....	16
1 Historique de la mitochondrie .....	16
1.1 Découverte .....	16
1.2 Origine .....	16
2 Ultrastructure mitochondriale .....	17
2.1 Les membranes .....	18
2.2 L'espace intermembranaire.....	18
2.3 La matrice mitochondriale.....	19
3 Fonctions mitochondriales.....	19
3.1 Métabolisme énergétique .....	19
3.1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale.....	21
3.1.1.1 Complexe I .....	21
3.1.1.2 Complexe II .....	23
3.1.1.3 Complexe III .....	24
3.1.1.4 Complexe IV .....	26
3.1.1.5 ATP synthase.....	28
3.1.1.6 Les supercomplexes .....	29
3.1.2 Les transporteurs mitochondriaux .....	31
3.2 Régulation de la phosphorylation oxydative .....	32
3.2.1 Contrôle de la respiration mitochondriale (Brown, 1992) .....	32
3.2.2 Contrôle de la synthèse d'ATP .....	33
3.2.1.1 Découplage extrinsèque .....	33
3.2.1.2 Découplage intrinsèque.....	35
3.3 Espèces réactives de l'oxygène.....	36
3.3.1 Types d'ERO.....	36
3.3.2 Sources des ERO .....	37
3.3.2.1 Production mitochondriale d'ERO .....	37

3.3.2.2 Production par les NADPH oxydases.....	39
3.3.2.3 Autres sources d'ERO .....	39
3.3.3 Détoxification des ERO.....	40
3.3.4 Rôles dans l'hypertrophie myocardique et la cardioprotection .....	40
3.4 NO et mitochondrie .....	42
3.4.1 Synthèse du NO .....	42
3.4.1.1 La nNOS.....	43
3.4.1.2 La iNOS.....	44
3.4.1.3 La eNOS.....	45
3.4.1.4 La mtNOS .....	45
3.4.2 Effets mitochondriaux du NO.....	46
3.4.2.1 Inhibition de la cytochrome c oxydase.....	46
3.4.2.2 Autres cibles mitochondriales du NO.....	47
<b>Chapitre 2 : Mitochondrie et cardioprotection .....</b>	<b>49</b>
1 Altérations mitochondriales liées à l'ischémie-reperfusion .....	49
1.1 Dysfonctionnements mitochondriaux consécutifs à l'ischémie .....	50
1.1.1 Perte de la fonction mitochondriale pendant l'ischémie .....	50
1.1.2 Modification de l'homéostasie calcique .....	51
1.1.3 Génération d'ERO .....	51
1.1.4 Altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale .....	52
1.2 Dysfonctionnement mitochondrial lié à la reperfusion .....	53
1.2.1 Aggravation de la surcharge calcique .....	53
1.2.2 Dommages oxydants.....	53
1.3 Perméabilisation des membranes mitochondriales .....	54
1.3.1 Ouverture du mPTP .....	55
1.3.2 Perméabilisation de la membrane externe .....	57
2 La mitochondrie, cible privilégiée des stratégies cardioprotectrices.....	58
2.1 Stratégies ciblant directement la mitochondrie .....	58
2.1.1 Inhibition du mPTP .....	58
2.1.2 Modulation des flux calciques mitochondriaux .....	59
2.1.3 Limitation de la production d'ERO .....	60
2.2 Stratégies ciblant indirectement la mitochondrie .....	61

2.2.1 Mitochondrie et conditionnement myocardique .....	61
2.2.2 Activation pharmacologique des voies de survie .....	63
<b>Chapitre 3 : La protéine Hsp22</b> .....	<b>65</b>
1 Structure et fonction .....	65
2 Hsp22 dans le myocarde .....	66
2.1 Hsp22 et stress myocardique .....	66
2.2 Effets de la Hsp22 dans le myocarde .....	67
2.2.1 Hsp22 induit la croissance des cardiomyocytes .....	67
2.2.2 Effets sur la survie des cardiomyocytes .....	68
2.3 Voies de signalisation activées par Hsp22 .....	68
2.3.1 Voie Akt .....	68
2.3.2 Voie AMPK .....	69
2.3.3 Activation de STAT3 .....	71
2.3.4 Activation du protéasome .....	73
3 Hsp22 et cardioprotection .....	74
4 Autres effets de la protéine Hsp22 .....	77
4.1 Hsp22 et vieillissement .....	77
4.2 Hsp22 et cancer (Aurelian <i>et al.</i> , 2012) .....	79
<b>Objectifs</b> .....	<b>81</b>
<b>PARTIE II : METHODOLOGIE ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX</b> .....	<b>82</b>
1 Modèle murin .....	83
1.1 Description du modèle .....	83
1.2 Génotypage .....	84
1.3 Evaluation de l'hypertrophie ventriculaire .....	85
1.4 Traitements .....	85
1.4.1 Le L-N <sup>ω</sup> -Nitroarginine methyl ester (L-NAME) .....	85
1.4.2 Le 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) .....	85
2 Modèle d'ischémie-reperfusion régionale myocardique chez la souris anesthésiée .....	86
2.1 Préparation des animaux .....	86
2.2 Procédure chirurgicale d'ischémie-reperfusion myocardique .....	86
2.3 Evaluation de la taille de l'infarctus .....	87

3 Etude ex-vivo à partir de mitochondries cardiaques isolées .....	88
3.1 Préparation des extraits mitochondriaux.....	88
3.2 Dosage des protéines mitochondriales.....	88
3.3 Modèle in vitro d'hypoxie-réoxygénation sur mitochondries isolées .....	89
3.4 Etude de la fonction respiratoire mitochondriale .....	89
3.4.1 Etude de la respiration mitochondriale .....	89
3.4.2 Etude de l'activité des complexes respiratoires.....	90
3.4.4.1 Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase) .....	90
3.4.4.2 Complexe II (succinate déshydrogénase).....	91
3.4.4.3 Complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase) .....	91
3.4.4.4 Complexe IV (cytochrome c oxydase) .....	91
3.4.3 Etude de la production d'ERO .....	92
3.5 Etude du potentiel de membrane mitochondrial.....	93
3.6 Etude de la sensibilité de l'ouverture du mPTP à une surcharge calcique .....	94
3.7 Etude du gonflement mitochondrial induit par le Ca <sup>2+</sup> .....	95
3.8 Etude de la production de NO .....	95
4 Etude de l'expression de protéines .....	95
4.1 Western-Blot.....	95
4.2 PCR quantitative.....	97
4.2.1 Extraction des ARN .....	97
4.2.2 Transcription inverse.....	97
4.2.3 PCR quantitative en temps réel .....	97
5 Etude du stress oxydant.....	99
5.1 GSH/GSSG .....	99
5.2 Mesure de l'activité de la NADPH oxydase .....	99
5.3 Mesure de l'activité de la xanthine oxydase .....	100
6 Analyse statistique.....	100
<b>PARTIE III : RESULTATS.....</b>	<b>101</b>
<b>Résultat 1: La protéine H11 kinase/Hsp22 stimule la phosphorylation oxydative et module la production d'ERO mitochondriaux via des mécanismes dépendants du NO.....</b>	<b>102</b>
1 Objectif de l'étude.....	102

2	Protocoles expérimentaux.....	102
3	Résultats .....	103
3.1	La protéine Hsp22 active la chaîne respiratoire mitochondriale.....	103
3.2	La protéine Hsp22 module la production d'ERO mitochondriale.....	103
3.3	Hsp22 augmente la production de NO mitochondriale .....	104
3.4	Hsp22 limite l'ouverture du mPTP .....	104
3.5	Hsp22 régule la respiration mitochondriale par un mécanisme NO-dépendant ....	104
3.6	Effet de l'anoxie sur la chaîne respiratoire mitochondriale .....	104
4	Conclusion.....	105

**Résultat 2 : La sur-expression de la protéine Hsp22 réduit l'atteinte des fonctions mitochondriales sur un modèle d'ischémie-reperfusion régionale** 106

1	Objectif de l'étude.....	106
2	Protocoles expérimentaux.....	106
3	Résultats .....	107
3.1	Hsp22 diminue la taille de l'infarctus .....	107
3.2	Hsp22 améliore l'activité de la chaîne respiratoire après ischémie-reperfusion ....	107
3.3	La production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> n'est pas modifiée après ischémie-reperfusion.....	109
3.4	Hsp22 limite l'ouverture du mPTP après ischémie-reperfusion.....	109
4	Conclusion.....	111

**Résultat 3 : Le stress oxydant est un acteur majeur de l'hypertrophie myocardique et de la mort prématurée chez la souris sur-exprimant Hsp22 dans le myocarde** ..... 113

1	Objectif de l'étude.....	113
2	Protocoles expérimentaux.....	113
3	Résultats .....	114
3.1	La sur-expression d'Hsp22 réduit la durée de vie et est associée à l'apparition de marqueurs de sénescence.....	114
3.2	La sur-expression d'Hsp22 induit un stress oxydant.....	115
3.3	Le traitement tempol abolit le stress oxydant chez la souris TG.....	115
3.4	Rôle du stress oxydant dans l'hypertrophie, la cardioprotection et la sénescence induites par Hsp22 .....	115
3.5	L'effet cardioprotecteur conféré par Hsp22 n'est pas altéré chez les souris âgées	116

4	Conclusion.....	116
	<b>Discussion générale</b> .....	117
1	Rôle de la mitochondrie dans l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22 .....	117
2	Rôle du stress oxydant dans les effets induits par Hsp22 .....	121
	<b>Références bibliographiques</b> .....	129

# Glossaire

$\Delta\Psi_m$	Potentiel de membrane mitochondrial
AAR	Aire à risque
Acyl-CoA	Acyl-Coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AI	Aire infarctée
AIF	Apoptosis inducing factor
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
ANT	Adenine nucleotide translocator
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BH <sub>4</sub>	Tétrahydrobioptérine
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Albumine sérique bovine
C-Term	Extrémité carboxyle
CaM	Calmoduline
CCCP	Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CK	Créatine kinase
CK2	Caséine kinase 2
CO	Monoxyde de carbone
CR	Coefficient respiratoire
CRC	Capacité de rétention calcique
CRM	Chaîne respiratoire mitochondriale
CsA	Cyclosporine A
Ct	Cycle treshold
Cyt c	Cytochrome c
CyP-D	Cyclophiline D
DAF	Diaminofluorescein
DCIP	2,6-Dichlorophénol Indophénol



DNP	2,4 dinitrophénol
DTNB	Acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
EDRF	Endothelial-derived relaxing factor
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EGTA	Ethylène glycol tétraacétique
eNOS	NO synthase endothéliale
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2)
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FCCP	4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone
FMN	Flavine mononucléotide
FVB	Friend virus B
GLUT	Glucose transporter
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSK-β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GSSG	Glutathion oxide
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HA	Hémagglutinine
HIF	Hypoxic inducible factor
HKII	Hexokinase II
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp	Heat shock protein
IL	Interleukine
IR	Ischémie-reperfusion
iNOS	NO synthase inductible
JAK	Janus kinase
K <sup>+</sup>	Ion potassique
KCN	Cyanure de potassium
L-NAME	L-N <sup>ω</sup> -Nitroarginine methyl ester

L-NMMA	N <sup>ω</sup> -monométhyl-L-arginine
L-NNA	L-N <sup>ω</sup> -Nitroarginine
MAC	Mitochondrial apoptosis induced channel
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase (MEK1/2)
MHC	Myosin heavy chain
mitoK <sub>ATP</sub>	Canaux potassiques mitochondriaux ATP-dépendants
mPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mtNOS	NO synthase mitochondriale
mtTFA	Mitochondrial transcription factor A
N-Terminale	Extrémité amine
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitrobleu de tétrazolium
NF-κB	Nuclear factor kappa B
nNOS	NO synthase neuronale
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trioxyde d'azote
NO <sub>2</sub>	Dioxyde d'azote
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ion nitrite
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase
NRF-1	Nuclear respiratory factor 1
·OH	Radical hydroxyle
OMS	Organisation mondiale de la Santé
ONOO <sup>-</sup>	Anion peroxydinitrite
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
P70S6K	p70 ribosomal S6 protein kinase
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis
PBR	Récepteur périphérique aux benzodiazépines
PCI	Pré-conditionnement iscémique
PCR	Polymerase chain reaction

PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha
Pi	Phosphate inorganique
PiC	Transporteur de phosphate
PI <sub>3</sub> K	Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PoCI	Post-conditionnement ischémique
PTIO	2-Phényl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
RISK	Reperfusion injury salvage kinase
rpm	Rotations par minute
RT	Rétrotranscription
SAFE	Survivor activating factor enhancement
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sHsp	Small heat shock protein
SOD	Superoxyde dismutase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAK	Transforming growth factor $\beta$ -activated kinase 1
TBS-T	Tampon Tris-Tween 20
Tempol	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
Tf	Température de fusion
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TOM	Translocase of the outer membrane
TSPO	Protéine translocatrice mitochondriale
TTC	Chlorure de triméthyl tétrazolium
UC	Uniporteur calcique
UCP	Uncoupling protein
UPR	Unfolded protein response
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VG	Ventricule gauche

# Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Ultrastructure mitochondriale.....	17
Figure 2 : La chaîne respiratoire mitochondriale .....	21
Figure 3 : Structure du complexe I .....	22
Figure 4 : Structure du complexe II .....	24
Figure 5 : Structure du complexe III .....	25
Figure 6 : Cycle des quinones.....	26
Figure 7 : Structure du complexe IV .....	27
Figure 8 : Structure de l'ATP synthase.....	28
Figure 9 : La synthèse de l'ATP.....	29
Figure 10 : Synthèse du NO par les NOS.....	43
Figure 11 : Altérations mitochondriales et cytosoliques se produisant lors de l'ischémie-reperfusion myocardique .....	50
Figure 12 : Modèle de mPTP proposé par Javadov et Karmazyn (2007).....	55
Figure 13 : Modèle de mPTP proposé par Leung et Halestrap (2008).....	56
Figure 14 : Modèle de mPTP proposé par Bernardi (2013).....	56
Figure 15 : Schéma des voies de survie mises en place lors des pré- et post-conditionnement myocardiques.....	62
Figure 16 : Activation de la voie JAK/STAT par Hsp22.....	73
Figure 17 : Activation des voies de survie par Hsp22.....	77
Figure 18 : Photographie d'une souris transgénique et d'une souris sauvage .....	83
Figure 19 : Représentation schématique de la cassette du transgène .....	84
Tableau 1 : Paramètres de PCR utilisés pour amplifier le gène H11K.....	85
Figure 20 : Consommation d'O <sub>2</sub> par les mitochondries dans différentes conditions.....	90
Figure 21 : Représentation schématique de la technique permettant de mesurer la production d'ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale.....	92
Figure 22 : Mesure du potentiel de membrane de mitochondries isolées au moyen d'une sonde fluorescente, la rhodamine 123.....	93
Figure 23 : Mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries traduisant leur résistance à l'ouverture du mPTP .....	94
Tableau 2 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la qPCR.....	98
Figure 24 : Hsp22 réduit la taille d'infarctus.....	107

Figure 25 : Hsp22 limite l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale après ischémie-reperfusion.....	108
Figure 26 : L'ischémie-reperfusion ne modifie pas la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par la chaîne respiratoire.....	109
Figure 27 : Hsp22 améliore la capacité de rétention calcique après ischémie-reperfusion ..	110
Figure 28 : Hsp22 limite le gonflement mitochondrial induit par l'ischémie-reperfusion.....	111
Figure 29 : Interaction entre les différentes sources d'ERO et rôle de la protéine Hsp22 ....	123

# Introduction générale

L'insuffisance coronarienne est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Elle regroupe un ensemble de maladies résultant du manque d'oxygénation du myocarde généralement lié à une atteinte des artères coronaires, se traduisant par l'angine de poitrine ou l'infarctus du myocarde. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, l'insuffisance coronarienne est responsable de 7,25 millions de décès par an dans le monde soit environ 12,8% de la mortalité mondiale totale (OMS, aide-mémoire n°310 de Juin 2011).

L'amélioration de la rapidité de la prise en charge des patients ainsi que le développement et l'amélioration des techniques de reperméabilisation des artères coronaires (par thrombolyse, angioplastie ou chirurgie cardiaque) ont été à l'origine d'une réduction spectaculaire de la morbi-mortalité de l'insuffisance coronaire aboutissant à une diminution d'un facteur 2 de la mortalité au décours d'un infarctus du myocarde, à une meilleure restauration de la fonction contractile et à une réduction de la fréquence des arythmies. Malgré le caractère indispensable de la reperfusion des artères coronaires, celle-ci constitue une cause supplémentaire de lésions myocardiques appelées lésions de reperfusion, d'où la nécessité de développer des stratégies cardioprotectrices ciblant principalement ces lésions. La découverte des conditionnements ischémiques qui procurent une puissante cardioprotection et qui consistent en de brefs cycles d'ischémie-reperfusion appliqués avant (pré-conditionnement) ou au cours de la reperfusion (post-conditionnement), a permis de valider le concept de cardioprotection et de stimuler l'exploration des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'établissement des lésions ainsi que la recherche d'alternatives pharmacologiques pour protéger le myocarde ischémié.

C'est ainsi que le rôle prépondérant de la mitochondrie a été mis en évidence. En effet, l'une des causes majeures de la mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion est un dysfonctionnement mitochondrial engendré par l'altération de l'imperméabilité des membranes mitochondriales. L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale conditionne l'établissement d'un potentiel de membrane qui permet la synthèse l'ATP et empêche la sortie de protéines pro-apoptotiques. L'altération de cette imperméabilité est notamment causée par l'ouverture, dans les premières minutes de la reperfusion, d'un pore situé au niveau des points de contact entre les membranes internes et externes. Ce pore est

appelé pore de transition de la perméabilité mitochondriale (mPTP). La mitochondrie représente donc une cible privilégiée pour le développement de nouvelles stratégies cardioprotectrices et est généralement l'un des acteurs finaux de celles qui ont déjà été décrites.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à une stratégie cardioprotectrice originale qui a été initialement décrite en 2001 par le Dr C. Depré et ses collaborateurs. Elle consiste à sur-exprimer spécifiquement dans le myocarde le gène codant pour la protéine de choc thermique *Heat shock protein 22* (Hsp22) et elle est particulièrement efficace puisque équivalente au pré-conditionnement ischémique (PCI) en terme de réduction des lésions. Cette protéine est capable d'activer des acteurs clés de la survie cellulaire qui sont également impliqués dans les voies du PCI et qui aboutissent à l'inhibition de l'ouverture du mPTP.

Dans ce travail de thèse, nous avons recherché si l'effet cardioprotecteur conféré par la sur-expression de la protéine Hsp22 ne serait pas dû à un effet direct ou indirect sur les fonctions mitochondriales conduisant à leur protection.

Le présent manuscrit se compose de 2 parties :

- 1) La première reprend, en trois chapitres, les données générales de la littérature sur la mitochondrie, son rôle dans l'effet cardioprotecteur et la protéine Hsp22.
- 2) La deuxième décrit l'étude expérimentale en présentant les protocoles mis au point et utilisés au cours de cette thèse, les résultats obtenus et leur discussion.

## **PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



# Chapitre 1 : La mitochondrie

## 1 Historique de la mitochondrie

### 1.1 Découverte

La mitochondrie, du grec *mitos* (fil) et *chondros* (grain), a été décrite pour la première fois en 1850 par La Valette St. George. Puis Kölliker initia, il y a plus de 150 ans, les premières recherches scientifiques sur la mitochondrie en décrivant leur morphologie au niveau des fibres musculaires cardiaques. Il fallut cependant attendre la fin du XIXe siècle pour que les mitochondries soient reconnues et identifiées comme des organites cellulaires. La recherche sur la mitochondrie a connu un essor important il y a 60 ans qui a permis de répertorier leurs fonctions (synthèse de l'ATP, synthèse de métabolites, thermogénèse...) et de mettre en évidence qu'elles étaient le siège des réactions de phosphorylation oxydative, du cycle de Krebs et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Après une période de stagnation, la recherche sur la mitochondrie a connu un regain d'intérêt à la fin des années 90 lorsque son rôle dans la mort cellulaire par apoptose a été découvert (Liu *et al.*, 1996 ; Petit *et al.*, 1996). Les recherches sur la mitochondrie ont abouti à l'attribution de deux prix Nobel, à Peter Mitchell en 1978 pour sa théorie chimio-osmotique, puis à Boyer et Walker en 1997 pour l'étude de la structure et du fonctionnement de l'ATP synthase.

### 1.2 Origine

L'hypothèse d'une origine endosymbiotique des mitochondries, développée dans les années 60, est aujourd'hui communément acceptée. Elle postule que les mitochondries seraient les descendantes d'une bactérie incorporée dans une cellule-hôte possédant un noyau. Cette hypothèse a ensuite été appuyée par la découverte de nombreuses similarités entre les bactéries et les mitochondries tant au niveau biochimique que génétique. Des travaux récents ont permis de reformuler cette hypothèse en précisant que l'ancêtre mitochondrial serait en fait apparu en même temps que le noyau lors de la fusion d'une archéobactérie hôte avec une protéobactérie.

## 2 Ultrastructure mitochondriale

Présentes dans le cytoplasme de la plupart des types cellulaires eucaryotes, les mitochondries présentent une grande diversité de taille, de forme et de nombre en fonction des besoins en énergie ainsi que du type cellulaire. Cependant leur ultrastructure reste identique. Sans cesse en mouvement au moyen d'interactions avec les protéines associées au cytosquelette, leur localisation correspond aux zones de haute consommation énergétique. Deux membranes (une interne et une externe) délimitent trois espaces distincts : le milieu extra-mitochondrial (cytoplasme de la cellule), la matrice intramitochondriale et l'espace intermembranaire. La membrane interne présente de nombreuses invaginations, appelées crêtes mitochondriales, ce qui augmente considérablement sa surface d'échanges (Figure 1). Les mitochondries renferment deux types de crêtes : lamellaires et tubulaires (sauf au niveau de la graisse brune où seules les crêtes lamellaires sont présentes) et l'espace délimité par ces crêtes est relié à la membrane interne par un grand nombre de jonctions étroites.

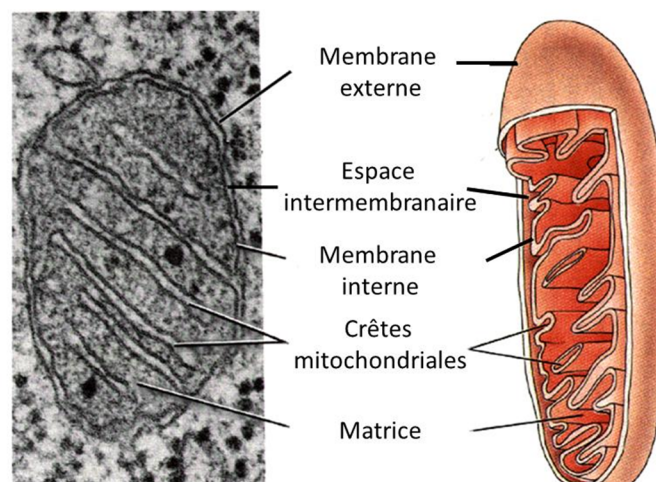


Figure 1 : Ultrastructure mitochondriale. La mitochondrie est composée d'une double membrane délimitant un espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La membrane interne forme de nombreux replis appelés crêtes mitochondriales.

Malgré cette compartimentation liée à leur double membrane, les mitochondries sont en contact étroit entre elles, comme l'attestent les processus de fusion et de fission mitochondriales, ainsi qu'avec les autres constituants cellulaires (le noyau, le réticulum endoplasmique ou encore le cytosquelette).

## 2.1 Les membranes

La membrane externe est une membrane classique, lisse, composée de 40% de lipides et de 60% de protéines. Elle se caractérise par sa grande perméabilité aux ions et aux molécules hydrophiles d'une masse moléculaire inférieure à 10 kDa. Cette perméabilité est liée à la présence de porines (appelées *voltage dependent anion channel* ou VDAC), protéines de 30 kDa qui forment des canaux dans la membrane externe. L'ouverture de ces canaux dépend du potentiel de membrane et peut être régulée par divers stimuli (pH de la matrice par exemple). Ces porines servent également de point d'ancrage à la fois du côté cytosolique pour certaines protéines du cytosquelette ou des kinases cellulaires mais également du côté de l'espace intermembranaire pour le cytochrome c. Des molécules de taille plus importante peuvent également traverser cette membrane *via* un transport actif grâce à des translocases de la membrane externe (ou TOM pour *Translocase of the Outer Membrane*) qui sont des complexes multiprotéiques.

La membrane interne est une membrane très spécialisée, caractérisée par sa composition riche en protéines (80%). Elle ne contient que 20% de lipides dont une proportion élevée de cardiolipine (20%) qui contribuerait à rendre la membrane interne imperméable aux ions et la rendrait relativement plus rigide que les autres membranes.

Cette membrane est quasi imperméable à la plupart des ions (en particulier aux protons) et des métabolites. Elle dispose donc de systèmes très sélectifs pour assurer le transport transmembranaire des ions et du combustible nécessaire au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. De nombreuses protéines sont enchâssées dans la membrane interne comme par exemple les protéines des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ou la translocase pour les nucléotides adényliques *Adenine Nucleotide Translocator* (ANT).

Il existe des zones de contact étroit entre ces 2 membranes. Ces zones sont des structures dynamiques et c'est à leur niveau que se trouvent des pores de translocation qui facilitent l'importation des protéines cytosoliques vers la mitochondrie *via* des translocases appartenant aux deux membranes.

## 2.2 L'espace intermembranaire

La taille de l'espace intermembranaire varie en fonction de l'activité respiratoire étant ainsi plus étroit lors d'une activité intense (entre 6 et 8 nm). Du fait de la perméabilité de la membrane externe, sa composition est très proche de celle du cytoplasme en ce qui

concerne les petites molécules. Il renferme un certain nombre de protéines, dont le cytochrome c qui participe au fonctionnement de la chaîne respiratoire et au processus apoptotique ainsi que d'autres protéines proapoptotiques telles que l'*apoptosis inducing factor* (AIF).

### 2.3 La matrice mitochondriale

La matrice mitochondriale contient une grande quantité d'enzymes, dont celles nécessaires au cycle de Krebs, à l'oxydation du pyruvate et des acides gras. Plusieurs copies (5 à 10) circulaires de l'ADN mitochondrial sont également présentes dans la matrice, ainsi que la machinerie protéique nécessaire à la transcription puis à la traduction. Le génome mitochondrial humain contient 37 gènes codant pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiaux et 13 protéines de la membrane interne qui sont des sous-unités des différents complexes de la chaîne respiratoire.

## 3 Fonctions mitochondriales

### 3.1 Métabolisme énergétique

Une source d'énergie est indispensable à tout organisme vivant. Chez les organismes aérobies, la phosphorylation oxydative et dans une moindre mesure la glycolyse génèrent l'énergie nécessaire au fonctionnement de la machinerie cellulaire sous forme d'ATP. Bien qu'elle soit le siège de nombreuses réactions et qu'elle remplisse plusieurs fonctions importantes dans les cellules eucaryotes, la mitochondrie se définit avant tout comme la principale centrale énergétique de la cellule. La synthèse de l'ATP est couplée à l'oxydation de coenzymes réduits et de certains métabolites au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale *via* la phosphorylation oxydative. La théorie chimio-osmotique proposée par Mitchell (1961) semble toujours la plus adéquate pour expliquer ce processus de transduction d'énergie qui permet la transformation d'une énergie osmotique (un gradient de protons) en énergie chimique utilisable par la cellule (l'ATP). Cette théorie repose sur la faible perméabilité aux protons et la faible conductivité pour les molécules chargées de la membrane interne. Elle postule que la chaîne respiratoire mitochondriale permet l'établissement d'un gradient électrochimique de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire qui représente le seul intermédiaire énergétique fournissant l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP.

Les coenzymes réduits NADH et FADH<sub>2</sub>, fournis par le cycle de Krebs, servent de donneurs d'électrons à un accepteur final qui est l'O<sub>2</sub>. Le transfert des électrons se fait par une succession de réactions d'oxydoréduction entre des transporteurs spécifiques appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale. Parmi ces transporteurs, il y a :

- l'ubiquinone (ou coenzyme Q) qui est une benzoquinone hydrophobe et qui peut accepter un ou deux électrons pour former le radical semiquinone ou l'ubiquinol ;

- le cytochrome c, protéine hémique soluble associée à la membrane interne par des liaisons électrostatiques, qui contient un atome de fer et qui peut accepter un électron ;

- des centres fer/soufre.

Ces transporteurs peuvent être associés à des sous-unités protéiques formant ainsi de grands complexes multiprotéiques enchâssés dans la membrane interne qui sont au nombre de 4 (complexes I à IV). Ces complexes ne sont pas présents dans des proportions identiques, ainsi pour une molécule de complexe I, on trouve 2 complexes II, 3 complexes III et 7 complexes IV.

Les électrons sont fournis par le NADH et le FADH<sub>2</sub> respectivement au complexe I et II, puis sont ensuite transférés à l'ubiquinone, véritable plaque tournante du trafic électronique dans la chaîne respiratoire. Les électrons sont ensuite acheminés au complexe III puis IV *via* le cytochrome c. Le complexe IV les transfère enfin à l'accepteur final, l'O<sub>2</sub>. Ces transferts successifs d'électrons s'accompagnent d'une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV ce qui crée un gradient électrochimique, ou force protomotrice, qui peut se décomposer en une différence de potentiel électrique transmembranaire et un gradient de pH de part et d'autre de la membrane interne. Ce gradient de protons est ensuite utilisé par le complexe V de la chaîne respiratoire, aussi appelé ATP synthase, pour synthétiser à partir d'ADP et de Pi l'ATP qui est la forme d'énergie chimique utilisable par la machinerie cellulaire. L'ensemble de cette réaction s'appelle la phosphorylation oxydative (voir figure 2).

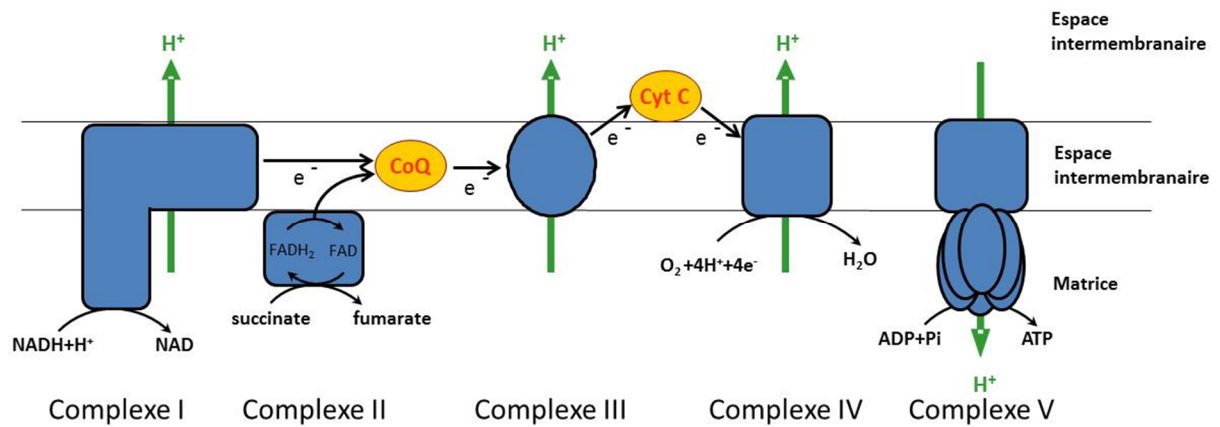


Figure 2 : La chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 5 complexes. Les coenzymes réduits du cycle de Krebs fournissent des électrons au complexes I et II puis sont transférés *via* des transporteurs spécifiques (l'ubiquinone et le cytochrome c) jusqu'au complexe IV et l'accepteur final qui est l'O<sub>2</sub>. Ce transfert d'électrons s'accompagne au niveau des complexes I, III et IV d'une sortie de proton qui permet l'établissement d'un gradient de protons utilisés par le complexe V pour synthétiser l'ATP. NAD, nicotinamide adénine dinucléotide ; FAD, flavine adénine dinucléotide ; CoQ, ubiquinone ; Cyt C, cytochrome c.

### 3.1.1 La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale se compose de 5 complexes enchâssés dans la membrane interne mitochondriale. Elle a été caractérisée par l'utilisation d'inhibiteurs, par l'étude des états respiratoires stationnaires (Chance et Williams, 1956) et par l'isolement des différents complexes la constituant.

#### 3.1.1.1 Complexe I

Le complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (980 kDa). Il est composé de 44 sous-unités chez les mammifères, dont 7 codées par le génome mitochondrial. Des études en microscopie électronique ont révélé une structure en forme de L, l'un des bras étant inséré dans la membrane interne, l'autre se projetant dans la matrice mitochondriale (Guenebaut *et al.*, 1998 ; Grigorieff, 1999 ; Djafarzadeh *et al.*, 2000). Le site de fixation du NADH se trouve au bout de ce bras matriciel. Le transfert des électrons se fait depuis une flavine mononucléotide (FMN) située à proximité du site de fixation du NADH jusqu'au site de liaison à la quinone *via* 8 centres Fer-Soufre, tous également situés dans le bras matriciel (Vinogradov, 2001). Le NADH donne 2 électrons qui sont ensuite transférés successivement jusqu'à l'ubiquinone. La réduction de la quinone s'accompagne du pompage de 4 protons vers l'espace intermembranaire (Weiss et Friedrich, 1991). Le complexe I contient 4 canaux

au travers de la membrane interne qui pourraient prendre en charge chacun le pompage d'un proton bien que des études récentes avancent plutôt un rapport de 3 protons par molécule de NADH (Wikstrom et Hummer, 2012). L'ubiquinone se fixe au complexe I dans une cavité, située à l'interface entre les 2 bras, contenant des résidus hydrophiles qui interagissent probablement avec les résidus hydrophiles de l'ubiquinone (voir figure 3).

*In vitro* le complexe I est capable de se lier à plusieurs déshydrogénases comme la pyruvate, la malate ou encore l' $\alpha$ -ketoglutarate déshydrogénase (Sumegi et Srere, 1984) ce qui permettrait de former une organisation enzymatique cohérente puisque la formation et l'oxydation du NADH serait plus efficacement couplées.

L'inhibiteur le plus connu du complexe I est la roténone, un flavonoïde synthétisé par certaines plantes tropicales. La roténone empêche le transfert des électrons du dernier centre Fer-Soufre à l'ubiquinone en se fixant au site de fixation de cette dernière. Les différents inhibiteurs du complexe I sont soit des analogues hydrophiles du NADH (adénosine diphosphate ribose) ou des analogues hydrophobes de l'ubiquinone (roténone, piéricidine A, amytal) qui agissent donc au départ ou à la fin du transport des électrons du complexe I (Degli Esposti, 1998). A ce jour, aucun inhibiteur capable d'inhiber le flux d'électrons dans le complexe I n'a été découvert.

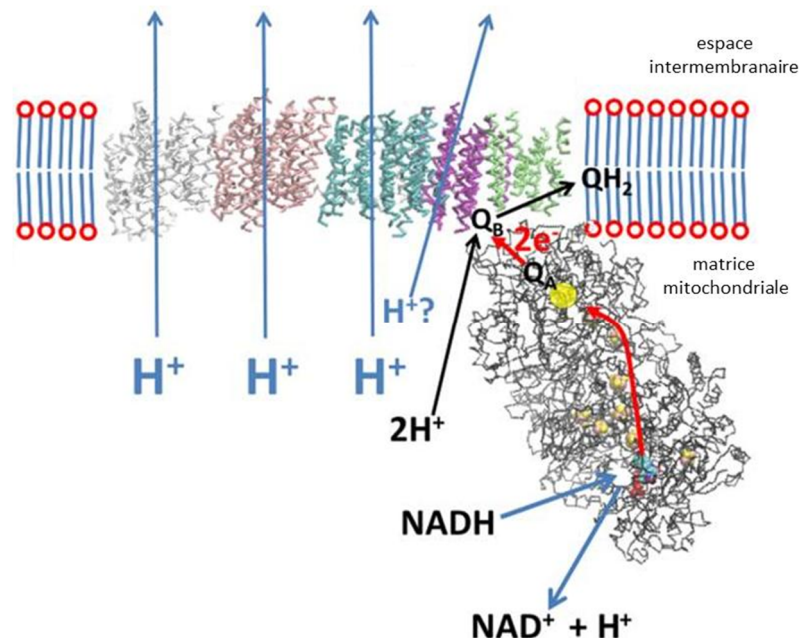


Figure 3 : Structure du complexe I (Wikstrom et Hummer, 2012). Ce complexe multiprotéique en forme de L présente un bras matriciel et un bras membranaire. Les électrons sont transférés depuis le site de fixation matriciel du NADH jusqu'à l'ubiquinone dont le site de fixation est situé à l'interface des deux bras. NAD, nicotinamide adénine dinucléotide ; Q, ubiquinone.

### 3.1.1.2 Complexe II

Le complexe II ou succinate-ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase présente la particularité d'être à la fois une enzyme du cycle de Krebs et un complexe de la chaîne respiratoire. Il est composé de 4 sous-unités codées par le génome cellulaire (Lancaster et Kroger, 2000) (voir figure 4) :

- 2 sous-unités hydrophobes (SdhC et SdhD) qui assurent l'ancrage du complexe à la membrane interne, contenant le cytochrome b, un groupement hème et le site de fixation à l'ubiquinone ;

- 2 sous-unités hydrophiles, une flavoprotéine (SdhA) contenant une flavine adénine dinucléotide (FAD), le site de fixation des acides dicarboxyliques et une protéine Fer-Soufre contenant 3 centres Fer-Soufre (SdhB).

Au niveau du complexe II, le succinate est oxydé en fumarate, fournissant deux électrons *via* la réduction du FAD en FADH<sub>2</sub>. Les électrons sont ensuite transférés à l'ubiquinone *via* les 3 centres Fer-Soufre (Hagerhall, 1997). Le transfert d'électrons au niveau du complexe II n'est pas couplé à un transfert de protons (Hederstedt, 2003). Bien que le rôle de l'hème du complexe II ne soit pas clairement établi, certaines études avancent que le premier électron transféré à l'ubiquinone pourrait aller et venir entre l'ubiquinone et l'hème ce qui empêcherait une réaction avec l'oxygène moléculaire et donc la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Yankovskaya *et al.*, 2003).

On distingue deux classes d'inhibiteurs du complexe II en fonction du site de liaison : ceux qui se lient au site de fixation du succinate (malonate, oxaloacétate, malate) et ceux qui se lient au site de fixation de l'ubiquinone (carboxine, thénoltrifluoroacétone). Le malate et l'oxaloacétate sont deux intermédiaires du cycle de Krebs et leur effet sur le complexe II pourrait exercer un rôle protecteur en limitant la production d'ERO induite par le retour des électrons du complexe II vers le complexe I (Rustin et Lance, 1991).



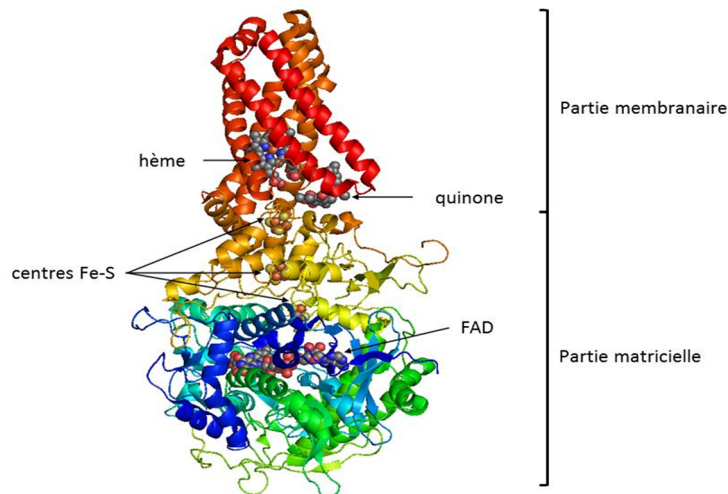


Figure 4 : Structure du complexe II. Le complexe II est composé d'une partie hydrophobe permettant l'ancrage à la membrane qui contient le site de fixation de l'ubiquinone et d'une partie hydrophile matricielle contenant le site de fixation des acides dicarboxyliques et la flavine adénine dinucléotide (FAD). Les électrons sont transférés depuis le succinate jusqu'à la quinone *via* des centres Fer-Soufre et l'hème.

### 3.1.1.3 Complexe III

Le complexe III ou ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase est un homodimère de 480 kDa. Chaque monomère est constitué de 11 sous-unités protéiques dont une est codée par le génome mitochondrial (le cytochrome b). Parmi ces 11 sous-unités, 3 participent au couplage entre le flux d'électrons et le transfert de protons, ce sont :

- le cytochrome b qui possède deux groupements hème de type b (les hèmes  $b_L$  et  $b_H$ ) ;
- le cytochrome c1 qui possède un groupement hème de type c ;
- une protéine Fer-Soufre appelée protéine de Rieske (Rieske *et al.*, 1964).

Les autres sous-unités protéiques s'organisent autour de ce complexe protéique métallique. Six d'entre elles sont des protéines de faible poids moléculaire dont le rôle n'est pas clairement identifié tandis que les 2 dernières, appelées Core 1 et Core 2 seraient impliquées dans la maturation et l'assemblage du complexe III.

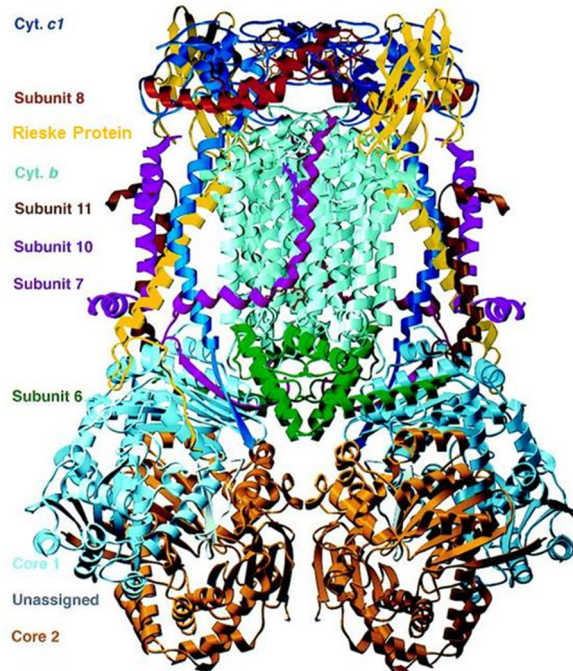


Figure 5 : Structure d'un homodimère de complexe III de mitochondrie de cœur de boeuf (Kim *et al.*, 1998).

Le complexe III catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c soluble situé dans l'espace intermembranaire et le pompage concomitant de 4 protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, participant ainsi à l'établissement du gradient de protons.

Les électrons au sein du complexe III suivent un trajet circulaire appelé cycle Q qui fût suggéré par Mitchell (1975) puis détaillé par Brandt et Trumpower (1994) et validé par l'étude de la structure du complexe III en cristallographie (Xia *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 2000). L'ubiquinol est oxydé au niveau du site  $Q_0$  (proche de l'espace intermembranaire) situé entre la protéine de Rieske et le cytochrome b. Un électron de l'ubiquinol est d'abord transféré à la protéine de Rieske entraînant le relargage de deux protons dans l'espace intermembranaire et la formation d'une semiquinone qui cède alors un électron à l'hème  $b_L$  pour former une ubiquinone qui est libérée. La protéine de Rieske transfère alors l'électron au cytochrome c *via* le cytochrome c1 tandis que l'hème  $b_L$  cède son électron à l'hème  $b_H$ . L'hème  $b_H$  cède alors son électron à une ubiquinone au niveau du site  $Q_i$  (proche de la matrice mitochondrial), formant une semiquinone. Une seconde molécule d'ubiquinol subit le même processus d'oxydation au niveau du site  $Q_0$  et la semiquinone au niveau du site  $Q_i$

est alors être réduite en ubiquinol, réaction suivie d'une protonation consommant 2 protons de l'espace matriciel (figure 6).

Globalement, ce cycle conduit donc à l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone et s'accompagne de l'éjection de 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire et de la consommation de 2 protons dans la matrice ce qui permet la formation de deux cytochromes c réduits.

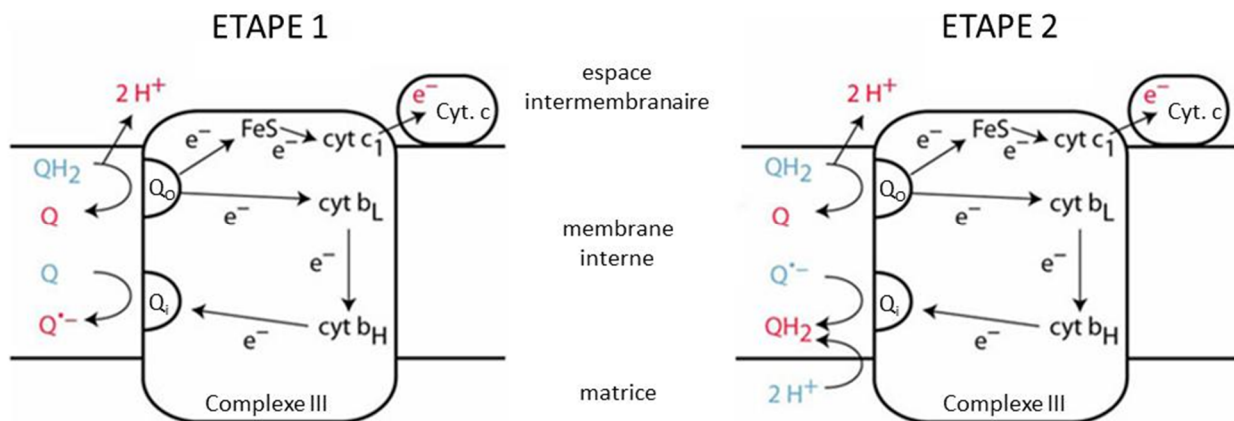


Figure 6 : Cycle des quinones (d'après <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=496>). Ce cycle se déroule en 2 étapes. Les réactifs de l'étape 1 sont les mêmes que les produits de l'étape 2 (*i.e.*  $Q$  et  $QH_2$ ) ce qui permet de retrouver l'état initial. Cyt  $b_H$ , cytochrome  $b_H$  ; Cyt  $b_L$ , cytochrome  $b_L$ ,  $Q$ , ubiquinone ;  $QH_2$ , ubiquinol ; cyt  $c$ , cytochrome  $c$ .

Le transfert des électrons peut être inhibé au niveau du site  $Q_i$  par l'antimycine A, ce qui bloque la réduction de l'ubiquinone par l'hème  $b_H$ . Le transfert des électrons à la protéine de Rieske (au niveau du site  $Q_0$ ) est inhibé par la stigmatelline et le myxothiazol qui se fixent respectivement sur un site proche de la protéine de Rieske et un site proche de l'hème  $b_L$ .

#### 3.1.1.4 Complexe IV

Le complexe IV ou cytochrome  $c$  oxydase est un homodimère de 400 kDa dont les dimères sont reliés par une cardiolipine. Chaque monomère est constitué de 14 sous-unités protéiques dont 3 sont codées par le génome mitochondrial (Balsa *et al.*, 2012). Le complexe IV contient 2 groupements hèmes (un cytochrome  $a$  et un cytochrome  $a_3$ ) et deux atomes de cuivre ( $Cu_A$  et  $Cu_B$ ). Le cytochrome  $a_3$  et l'atome de cuivre  $Cu_B$  forment un centre binucléaire où a lieu la réduction de l' $O_2$  en  $H_2O$ .

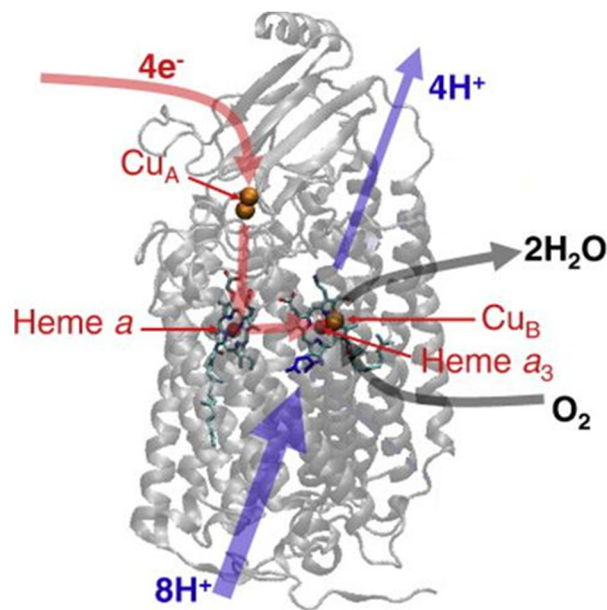


Figure 7 : Structure du cœur catalytique du complexe IV bovin (Kim et Hummer, 2012). Les chemins suivis par les électrons et les protons sont indiqués respectivement en rouge et en bleu. La flèche grise indique l'arrivée de l' $O_2$  et la sortie de l'eau résultant de la réaction redox ayant lieu au niveau du centre binucléaire formé par l'hème  $a_3$  et le  $Cu_B$ .

Les électrons transportés par le cytochrome c réduit sont transférés au site actif *via* le  $Cu_A$  puis le cytochrome a (Babcock et Wikstrom, 1992). Le mécanisme de réduction de l'oxygène intervient en deux grandes étapes. Dans une première étape, les deux métaux (fer de l'hème et cuivre) du centre binucléaire cytochrome  $a_3$ - $Cu_B$  sont réduits par 2 électrons provenant de 2 cytochromes c réduits. La deuxième étape commence par la fixation de l'oxygène au niveau de ce centre binucléaire qui est ensuite rapidement réduit en eau par l'apport de deux nouveaux électrons et de 4 protons.

Le processus global nécessite 4 cytochromes c réduits et 4 protons pour réduire une molécule d' $O_2$  en deux molécules d' $H_2O$  et cette réaction est couplée à la sortie de 4 protons dans l'espace intermembranaire, participant à l'établissement du gradient de protons (Wikstrom, 1977, 2004).

La cytochrome c oxydase est inhibée par le monoxyde d'azote (NO), le monoxyde de carbone (CO), les cyanides, les sulfides et les azides qui se fixent tous à la cytochrome c oxydase au niveau du site de fixation de l'oxygène, ce qui inhibe compétitivement cette enzyme et aboutit à un blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 3.1.1.5 ATP synthase

Le complexe V plus généralement dénommé ATP synthase est une grosse protéine en forme de champignon qui est composée de deux domaines principaux  $F_0$  et  $F_1$  (figure 8) :

- le domaine  $F_0$  est enchâssé dans la membrane interne. Il est composé de 12 sous-unités membranaires c formant un anneau en contact avec les sous-unités  $\gamma$  et  $\epsilon$  situées au centre du domaine  $F_1$ , d'une sous-unité a lié à un dimère de sous-unité b qui comporte une partie matricielle ;
- le domaine  $F_1$  globulaire, hydrosoluble, se projette dans la matrice. Il est composé de 5 sous-unités différentes : un hexamère  $\alpha_3\beta_3$  avec à l'intérieur la sous-unité  $\gamma$  sur laquelle se lie  $\epsilon$  et une sous-unité  $\delta$  qui est attachée au « sommet » de l'hexamère. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  portent les sites de fixation des nucléotides adényliques et  $\beta$  porte les sites catalytiques à l'interface avec  $\alpha$ .  $\gamma$  et  $\epsilon$  sont reliées à l'anneau d'oligomère de sous-unités c de  $F_0$  tandis que  $\delta$  est en contact avec le dimère de sous-unités b.

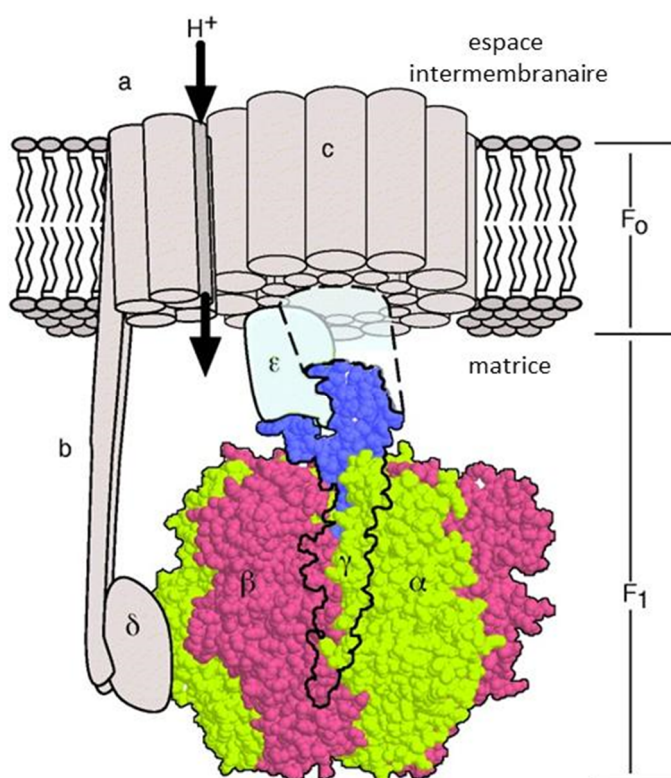


Figure 8 : Structure de l'ATP synthase (Wang et Oster, 1998). Elle possède une partie membranaire  $F_0$  composée de sous-unités  $c_{12}ab_1$  et une partie soluble  $F_1$  composée de sous-unités  $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$ . La partie  $c_{12}\gamma\epsilon$  se comporte comme un rotor alors que la partie  $ab\delta\alpha_3\beta_3$  est fixe et forme le stator. Les sites catalytiques sont situés à l'interface  $\alpha\beta$  et le canal à protons à l'interface entre c et a.

L'ATP synthase utilise le gradient de protons pour synthétiser l'ATP. Le couplage entre le flux de protons et la synthèse de l'ATP est réalisé grâce à un mécanisme unique de rotation. Lors du transfert de protons selon le gradient au travers de  $F_0$ ,  $F_0$  entre en rotation. Cette rotation est transmise à  $\gamma$  et  $\epsilon$  ce qui permet le changement de conformation des sites catalytiques (voir figure 9). L'ATP synthase peut également hydrolyser l'ATP en ADP + Pi ce qui expulse des protons. Cette réaction est importante notamment chez les bactéries en anaérobiose mais est finement contrôlée pour éviter une déplétion de l'ATP.

L'ATP synthase est inhibée par des molécules qui sont pour la plupart spécifiques de  $F_0$  ou de  $F_1$ . L'inhibiteur le plus connu est l'oligomycine qui se fixe à l'interface de la sous-unité a et de l'oligomère de c de  $F_0$  ce qui bloque le transfert de protons et donc la rotation de  $F_0$ .

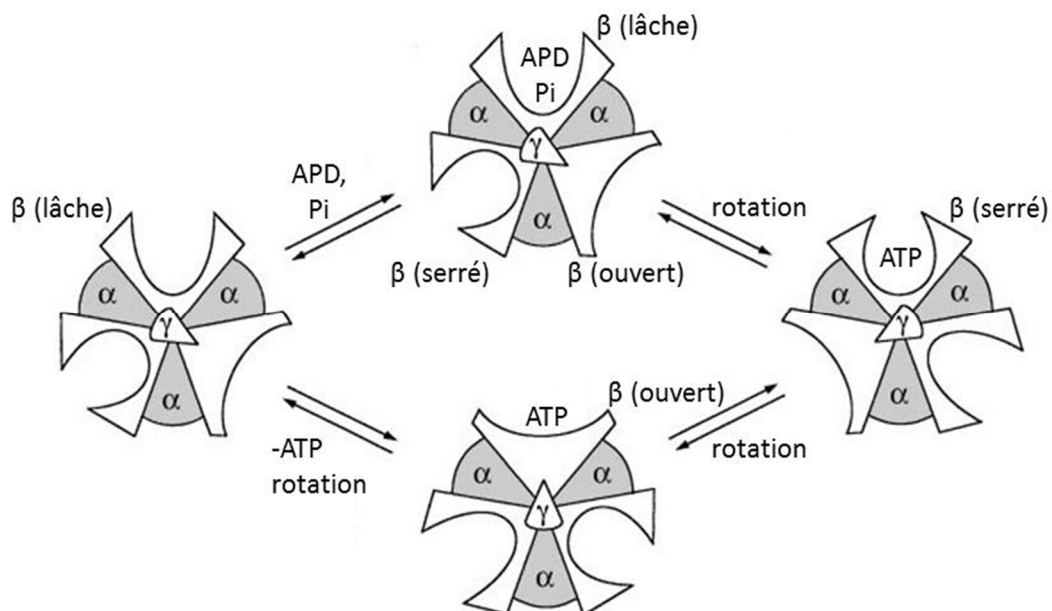


Figure 9 : La synthèse de l'ATP (Schultz et Chan, 2001). Trois conformations différentes du site  $\beta$  sont possibles (lâche, serré et ouvert) et chacun des 3 sites  $\beta$  est dans une conformation différente. La rotation de la sous-unité  $\gamma$  entraîne la modification de la conformation des 3 sites ce qui modifie les caractéristiques de liaison de  $\beta$ . ATP, adénosine triphosphate ; ADP, adénosine diphosphate, Pi, phosphate inorganique.

### 3.1.1.6 Les supercomplexes

La conception de l'organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale et des interactions entre les complexes a évolué ces dernières années. L'idée que les complexes diffusaient librement dans la membrane interne et que le transfert d'électrons résultait de

collisions aléatoires des complexes a été remplacée par un modèle d'interactions stables entre les complexes dans des unités fonctionnelles appelées supercomplexes ou respirasomes. Ces supercomplexes permettraient d'améliorer et d'accélérer le flux d'électrons entre les complexes en diminuant la distance de diffusion des transporteurs spécifiques (ubiquinone et cytochrome c) mais également d'éviter les fuites d'intermédiaires réactifs comme l'ubisemiquinone qui peut réagir avec l'oxygène et former des anions superoxydes ( $O_2^-$ ). Ainsi, des travaux récents ont permis de montrer que l'existence de ces supercomplexes réduit la production d'ERO notamment au niveau du complexe I (Maranzana *et al.*, 2013). Plusieurs types de supercomplexes différents ont été mis en évidence :

- supercomplexe I+III<sub>2</sub> : correspondant à une association latérale entre un dimère de complexe III et le bras membranaire d'un complexe I (Dudkina *et al.*, 2005 ; Schagger et Pfeiffer, 2000). Il existe également une forme moins abondante I<sub>2</sub>+III<sub>2</sub> (Bultema *et al.*, 2009) ;

- supercomplexe III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> : un dimère de complexe III peut également être associé à plusieurs copies du complexe IV (1 à 4) en fonction des espèces, cette association étant dépendante de la présence de cardiolipine qui ne serait pas indispensable à la formation de ce supercomplexe mais plutôt à sa stabilisation (Pfeiffer *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2002) ;

- supercomplexe I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> : ce supercomplexe, aussi appelé respirasome, représente la plus grosse structure individuelle de la chaîne respiratoire mitochondriale (Schagger et Pfeiffer, 2000). Le complexe III est latéralement associé au bras membranaire du complexe I et le complexe IV stabilise cet ensemble en s'associant à la fois avec le bras membranaire du complexe I et latéralement avec le complexe III ;

- dimères d'ATP synthase (Arnold *et al.*, 1998) : les deux monomères d'ATP synthase s'associent par leur partie membranaire F<sub>0</sub> et forment un angle qui peut être fixe ou varier entre 35 et 90°. Cette dimérisation serait essentielle à la morphologie des crêtes de la membrane interne puisqu'elle entraîne une courbure locale de cette membrane.

Il semblerait qu'il existe un niveau supérieur d'organisation de la chaîne respiratoire, associant plusieurs supercomplexes organisés en longues chaînes. Ainsi une interconnexion entre les respirasomes et les supercomplexes III<sub>2</sub>+IV<sub>4</sub> a été suggérée (Wittig *et al.*, 2006). De même un modèle de longues répétitions de supercomplexes I+II<sub>2</sub>+IV<sub>1</sub> a été proposé (Bultema *et al.*, 2009).

Enfin, la présence d'une organisation oligomérique de dimères d'ATP synthase qui forment de longues chaînes a été mise en évidence dans les mitochondries de nombreux organismes (Strauss *et al.*, 2008) ce qui permettrait d'optimiser la synthèse d'ATP au sein des crêtes mitochondriales qui agiraient comme des pièges à protons.

### 3.1.2 Les transporteurs mitochondriaux

Pour assurer le lien entre le cytosol et la matrice mitochondriale, la mitochondrie dispose d'une panoplie de transporteurs spécifiques nécessaires du fait de la très faible perméabilité de la membrane interne. Ce lien est indispensable car de nombreuses fonctions physiologiques requièrent la participation d'enzymes intra- et extra-mitochondriales. Une vingtaine de transporteurs mitochondriaux ont été découverts et ils transportent un large panel de substrats qui sont impliqués dans la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs, l'oxydation des acides gras, la gluconéogenèse, la lipogenèse, la synthèse d'ADN/ARN/protéines mitochondriales... Ces transporteurs, de type symport, uniport ou antiport utilisent comme source d'énergie soit la composante chimique (gradient de pH), soit la composante électrique (différence de potentiel) de la force protomotrice, soit l'une et l'autre. Ils peuvent être électrogéniques (accompagné d'un échange de charge) et le sens du transport est alors imposé par le potentiel de membrane comme c'est le cas pour l'ANT qui échange un  $\text{ATP}^{4-}$  matriciel contre un  $\text{ADP}^{3-}$  cytosolique. Ils peuvent également utiliser le gradient de pH en transportant la molécule simultanément avec un proton, ce qui diminue le gradient de proton et donc le potentiel de membrane malgré un échange neutre au niveau des charges transportées. C'est le cas du transporteur de phosphate (ou PiC) ainsi que du transporteur de glutamate qui sont des transporteurs directs. Les transporteurs électroneutres peuvent également être indirects comme le transporteur des acides dicarboxyliques (malate, succinate) qui échange un acide dicarboxylique cytosolique contre un phosphate matriciel qui est entré par le PiC.

Les protéines découplantes (UCP pour *uncoupling proteins*) sont également une sous-famille des transporteurs mitochondriaux ; il en existe 5 différentes (UCP1 à 5). Les mécanismes par lesquels les UCP dissipent le gradient électrochimique de protons ne sont pas totalement élucidés, UCP1 pourrait agir comme un protonophore mais cela reste controversé.



### 3.2 Régulation de la phosphorylation oxydative

L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est finement régulée par divers mécanismes afin de répondre précisément aux besoins cellulaires. Différents mécanismes de régulation ont été décrits.

#### 3.2.1 Contrôle de la respiration mitochondriale (Brown, 1992)

Les premières études sur ce sujet datent des années 50 et ont mis en évidence une relation entre la disponibilité des substrats de la phosphorylation oxydative (Pi et ADP), l'intensité respiratoire et la consommation d'oxygène. Chance et Williams (1956) avancèrent ainsi l'idée que la phosphorylation oxydative est sous contrôle des processus consommateurs d'ATP : l'hydrolyse de l'ATP entraîne une augmentation d'ADP et de Pi. La force protomotrice permet une synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi, ce qui a pour effet de diminuer cette force protomotrice qui stimule à son tour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cependant de nombreux résultats démontrent que ce concept purement cinétique ne peut être le seul mécanisme régulateur puisqu'il n'y a pas de corrélation entre l'ampleur de la force protomotrice et l'intensité de la respiration. L'activité de la chaîne respiratoire est aussi dépendante du rapport ATP/ADP. En effet, dans les mitochondries de cellules eucaryotes uniquement, l'ATP ou l'ADP peuvent se fixer au niveau d'une sous-unité matricielle du complexe IV et réguler la respiration. Ainsi quand le rapport ATP/ADP est élevé, c'est l'ATP qui se fixe à cette sous-unité et inhibe le complexe IV. L'apport d'ADP diminue le rapport ATP/ADP ce qui induit le remplacement de l'ATP fixé par de l'ADP et donc la stimulation de la chaîne respiratoire (Napiwotzki *et al.*, 1997).

D'autres mécanismes peuvent également entrer en jeu comme le contrôle de l'activité des déshydrogénases matricielles par le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  libre qui modifie la production de NADH et donc la synthèse d'ATP ou encore la régulation de l'apport en substrats respiratoires qui permet de répondre de façon précise et rapide aux besoins énergétiques de la cellule. L'augmentation de la consommation d'ATP s'accompagne d'une augmentation de la synthèse d'ATP, de la consommation d'oxygène par la mitochondrie et de l'utilisation de substrats au niveau de la chaîne respiratoire.

Enfin le NO et le CO, tous deux produits par l'organisme, peuvent agir sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, notamment en entrant en compétition avec l' $\text{O}_2$  au niveau du complexe IV ce qui en fait des régulateurs physiologiques de la chaîne respiratoire.

### 3.2.2 Contrôle de la synthèse d'ATP

La relation entre la respiration et la force protomotrice n'est pas linéaire (Nicholls, 1977). Une partie de la respiration mitochondriale n'est pas couplée à la synthèse d'ATP et l'énergie qui résulte de ce découplage est dissipée sous forme de chaleur. L'efficacité de la synthèse d'ATP peut être définie par la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommée (rapport ATP/O). Le rendement de la phosphorylation oxydative peut varier soit par modification de la force protomotrice liée à une perméabilité de la membrane interne aux protons ou cations (phénomène de fuite) qu'on appelle découplage extrinsèque soit par diminution de l'efficacité des pompes à protons (phénomène de patinage) qu'on appelle découplage intrinsèque.

#### 3.2.1.1 Découplage extrinsèque

Le découplage extrinsèque est lié à la perméabilité de la membrane interne aux protons ce qui entraîne une diminution du gradient de protons. La respiration et la synthèse d'ATP sont couplées grâce à la force protomotrice. Cependant une partie des protons peut entrer dans la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase et donc sans participer à la synthèse de l'ATP. Ce phénomène explique la présence d'une respiration mitochondriale qui est insensible à l'inhibition de l'ATP synthase. Une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons augmente donc la respiration basale et diminue la synthèse d'ATP et donc l'efficacité de la phosphorylation oxydative.

La fuite de protons à travers la membrane interne peut être basale ou induite. Dans le premier cas, elle dépend des propriétés physico-chimiques de la membrane interne et elle est caractérisée par une relation non-ohmique avec le potentiel de membrane. Ainsi, la fuite de protons induite par les hormones thyroïdiennes s'expliquerait en partie par une augmentation de la surface de la membrane interne mitochondriale (Brand *et al.*, 1992). La composition de la membrane joue également un rôle important dans sa perméabilité intrinsèque. En effet, l'apport de cardiolipine à des mitochondries isolées de foie de rat augmente la perméabilité membranaire aux protons (Bobyleva *et al.*, 1997). De même la composition des phospholipides de la membrane interne en acides gras est une composante déterminante dans ce phénomène, la fuite étant proportionnelle au rapport de la teneur en acides gras de la famille n-6 sur celle de la famille n-3 (Pehowich, 1999).

La fuite de protons n'est pas anecdotique puisqu'elle représente environ 26% du total de la consommation en  $O_2$  dans des hépatocytes isolés de rat et jusqu'à 38% pour l'animal entier (Brand *et al.*, 1994).

La fuite de protons peut également être induite par différents facteurs (endogènes ou exogènes) et elle est alors caractérisée par une relation ohmique avec le potentiel de membrane (sauf dans le cas d'UCP1). Les protéines découplantes UCP en recyclant les protons à travers la membrane interne augmentent la fuite de protons. Dans le tissu adipeux brun, riche en mitochondries et spécialisé dans la thermogénèse, les acides gras induisent un découplage générateur de chaleur en activant l'UCP1. La dissipation du gradient de protons par l'UCP1 convertit presque totalement l'oxydation des combustibles cellulaire en chaleur, conférant sa spécialisation à ce tissu. Le rôle des UCP2 et 3 reste peu connu. Skulachev (1996) puis Brand et Esteves (2005) ont développé le concept de découplage modéré induit par les UCP qui aurait un rôle dans la régulation de la production d'ERO. En effet, les UCP peuvent être activées par une augmentation de production d' $O_2^{\cdot -}$  tant au niveau de la matrice mitochondriale qu'au niveau extramitochondrial (Brand *et al.*, 2004). Leur activation induit une diminution de la force protomotrice, ou découplage modéré, et donc une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale qui aboutirait, en absence d'inhibition de celle-ci, à une diminution de la production d' $O_2^{\cdot -}$  (Turrens, 1997). Ce modèle de découplage modéré reste controversé et il semblerait que seule l'UCP1 soit capable d'induire un tel découplage (Shabalina et Nedergaard, 2011). Un rôle de l'UCP2 dans la thermogénèse induite par l'alimentation a été suggéré tandis que l'UCP3 a été évoquée en tant qu'effecteur de la fièvre.

D'autres protéines peuvent également jouer un rôle dans le découplage extrinsèque. Ainsi, des souris déficientes en isoforme 1 de l'ANT présentent une diminution importante de la conductance basale aux protons de la membrane interne et à l'inverse une sur-expression de l'ANT dans un modèle drosophile augmente cette conductance (Brand *et al.*, 2005). Un rôle de cette protéine a également été retrouvé dans le tissu adipeux brun où l'ANT1 participerait à la fuite basale de protons tandis que l'ANT2 contribuerait à l'effet découplant induit par les acides gras (Shabalina *et al.*, 2006).

Le découplage peut également être induit artificiellement par des découplants chimiques. Très utilisé entre 1933 et 1938 comme médicament anti-obésité après la découverte de ses propriétés accélérant le métabolisme, le 2,4 dinitrophénol (DNP) présente des propriétés

découplantes (Loomis et Lipmann, 1948) et induit à fortes doses une hyperthermie. De nombreuses autres molécules découplantes ont ensuite été découvertes. La plupart d'entre elles sont des acides faibles hydrophobes avec une charge délocalisée qui présentent une activité protonophore tels que le carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) ou le carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phenylhydrazone (FCCP) qui sont classiquement utilisés dans les études expérimentales. Leur activité protonophore est liée à leur charge négative délocalisée : ils captent un proton au niveau de l'espace intermembranaire puis traversent la membrane, relarguent ce proton au niveau de la matrice, retournent à leur point de départ et ainsi de suite. Les protons sont donc transportés vers la matrice, dissipant ainsi le gradient de protons (Terada, 1990). De même, certains ionophores peuvent également présenter des propriétés découplantes comme la valinomycine.

Des travaux menés par notre équipe ont également permis de mettre en évidence que le CO était capable d'induire un découplage modéré sur des mitochondries cardiaques de rat (Lo lacono *et al.*, 2011). D'autres travaux ont permis de déterminer le mécanisme par lequel le CO exercerait son effet découplant : le CO active le transport de phosphate dans la mitochondrie *via* le PiC qui s'accompagne d'une entrée de protons. L'augmentation de phosphate matriciel induirait un gonflement de la mitochondrie ce qui, avec l'entrée de protons, participerait à l'effet découplant (Long *et al.*, 2014).

#### 3.2.1.2 Découplage intrinsèque

Le modèle avançant l'hypothèse que les pompes à protons présenteraient un certain degré de découplage intrinsèque ou patinage a été développé par Pietrobon *et al.* (1983). Ce patinage se traduit par :

- une diminution de la stœchiométrie  $H^+$  expulsés/électrons transférés au niveau des pompes à protons de la chaîne respiratoire. Le transfert d'électrons ne s'accompagne pas d'une éjection de protons (« patinage redox ») ;
- une augmentation de la stœchiométrie  $H^+$  transféré/ATP produit au niveau de l'ATP synthase. Le passage des protons n'est plus totalement couplé à la synthèse de l'ATP (« patinage protonique »).

Bien qu'en théorie il puisse se produire au niveau de toutes les pompes, il semblerait que le patinage des pompes à protons n'ait de pertinence physiologique qu'au niveau du complexe IV et de l'ATP synthase (Kadenbach, 2003 ; Murphy et Brand, 1987 ; Papa *et al.*, 1991).

### 3.3 Espèces réactives de l'oxygène

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale induit la formation d'ERO lorsqu'un électron « s'échappe » du trajet classique et réduit l'O<sub>2</sub>. Ces ERO ont traditionnellement été décrits comme des produits toxiques du métabolisme pouvant altérer les constituants lipidiques, protéiques et l'ADN de la cellule. Cependant, les ERO sont avant tout des acteurs importants de la signalisation cellulaire et la régulation des métabolismes (Rhee, 1999) et le stress oxydant cellulaire est le résultat d'un déséquilibre de la balance entre la production d'ERO et la capacité antioxydante de la cellule. La cellule eucaryote doit maintenir un équilibre entre la production et la détoxification des ERO c'est pourquoi elle possède des systèmes antioxydants intrinsèques pour prévenir les dommages liés aux ERO.

#### 3.3.1 Types d'ERO

La réduction complète de l'O<sub>2</sub> conduisant à la formation d'eau nécessite 4 électrons, c'est la réaction qui se produit au niveau du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réduction peut s'effectuer en plusieurs étapes successives, l'oxygène étant alors partiellement réduit en radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et radical hydroxyle (<sup>•</sup>OH).

La réduction monoélectronique de l'oxygène aboutit à la formation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Du fait de sa très faible demi-vie, c'est l'ERO qui a la réactivité la plus faible vis-à-vis des substrats bio-organiques. Sa toxicité provient essentiellement de sa réaction avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui produit <sup>•</sup>OH (réaction de Haber-Weiss) bien plus délétère.

O<sub>2</sub><sup>-</sup> est ensuite pris en charge par des enzymes, les superoxydes dismutases, qui catalysent sa dismutation en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas un radical libre puisque tous ses électrons sont appariés mais il est toxique *via* la réaction de Fenton qui se produit en présence de cations métalliques comme le Fe<sup>2+</sup> ou le Cu<sup>+</sup> (Wardman et Candeias, 1996) et qui donne naissance à <sup>•</sup>OH. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est éliminé de la cellule par la catalase qui entraîne sa dismutation en eau et par la glutathion peroxydase qui catalyse sa réduction en eau par le glutathion.

<sup>•</sup>OH est l'espèce radicalaire la plus délétère. Du fait de son caractère très réactif, il réagit dès qu'il rencontre un substrat et diffuse donc très peu ce qui implique qu'il agit sur le lieu même de sa production. Il possède une très faible durée de vie (de l'ordre de la nanoseconde).

L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut également interagir avec le NO<sup>·</sup> pour former du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) qui présente une forte réactivité et peut endommager les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Le peroxynitrite est perméable et peut donc exercer son action à distance du lieu de sa production.

### 3.3.2 Sources des ERO

La production des ERO dans l'organisme est essentiellement enzymatique et découle du métabolisme cellulaire ou de réactions d'oxydoréduction. Cette production provient de plusieurs sources possibles qui sont essentiellement la chaîne respiratoire mitochondriale et la NADPH oxydase mais également la xanthine oxydase, les lipo et cyclo-oxygénases, le cytochrome P450 et les peroxysomes. Les NO synthases (NOS) peuvent également produire de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> sous certaines conditions.

#### 3.3.2.1 Production mitochondriale d'ERO

La source majoritaire d'ERO de l'organisme est la chaîne respiratoire mitochondriale. Lors du transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons peut intervenir et réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Cette fuite est de l'ordre de 1 à 3% des électrons transférés *in vitro* mais cette proportion serait beaucoup plus faible *in vivo* (Murphy, 2009). La fuite d'électrons augmente lorsque la concentration en O<sub>2</sub> ou le flux d'électrons à travers la chaîne augmentent et elle est dépendante du type de substrat utilisé. En effet, le taux de production est plus important en présence de succinate ou d'acyl-CoA (Kwong et Sohal, 1998). Elle dépend également de l'activité du complexe IV car une inhibition partielle de ce dernier (par le NO, le CO ou le KCN) augmente la production d'ERO (Srinivasan et Avadhani, 2012).

Si en théorie, cette fuite peut provenir de n'importe quel complexe de la chaîne respiratoire à l'état réduit, des études réalisées sur mitochondries isolées ont permis de localiser différents sites de production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> : deux se situeraient au niveau du complexe I et un autre au niveau du complexe III. Le complexe I serait la principale source d'ERO de la chaîne respiratoire. Les sites de production de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> au niveau du complexe I n'ont pas encore été clairement identifiés, l'un se situerait en aval du site de fixation de la roténone et il pourrait s'agir du site de liaison à l'ubiquinone tandis que l'autre serait localisé en amont de ce site de fixation et il s'agirait soit de la FMN soit de l'un des centres Fer-Soufre (Kowaltowski *et al.*, 2009). La production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> au niveau du complexe I est exclusivement matricielle.

La production d' $O_2^{\cdot -}$  au niveau du complexe III est beaucoup mieux connue. Elle fait intervenir l'intermédiaire radicalaire semiquinone instable qui est produit au niveau des sites  $Q_o$  et  $Q_i$ . Ce radical peut réduire une molécule d'oxygène, pour autant que celle-ci ait accès aux sites  $Q_o$  ou  $Q_i$ , générant  $O_2^{\cdot -}$  dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale.

Bien qu'étant une flavoprotéine, une production significative d' $O_2^{\cdot -}$  n'a pas été mise en évidence au niveau du complexe II, probablement parce que la structure de ce complexe empêche la fixation de l'oxygène sur le FAD (Yankovskaya *et al.*, 2003). Cependant, l'utilisation du succinate est une importante source d'ERO dans les tissus. En effet, elle génère un flux inverse des électrons du complexe II vers le complexe I *via* l'ubiquinone ce qui induit la formation d'une importante quantité d'ERO (Liu *et al.*, 2002). La génération d'ERO liée au retour des électrons est inhibée par la roténone, indiquant qu'elle se fait en amont du site de fixation de la roténone, voire au niveau de ce site lui-même. Cette production d'ERO est très sensible à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (Miwa et Brand, 2003).

Toutefois, la pertinence physiologique de ce phénomène reste indéterminée puisque la plupart des études ont été réalisées *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence de succinate seul. *In vivo* les mitochondries n'utilisent pas exclusivement du succinate mais une combinaison de plusieurs substrats. Une étude utilisant des mitochondries isolées respirant avec un mélange de substrats proche des conditions physiologiques (glutamate et succinate) a cependant permis de mettre en évidence une production d' $O_2^{\cdot -}$  induite par un retour des électrons du complexe II vers le complexe I (Muller *et al.*, 2008). D'autres études ont également montré que dans un état hypoxique ou anoxique, on observe des modifications importantes des concentrations relatives des substrats de la chaîne respiratoire mitochondriale et notamment une importante augmentation de la concentration en succinate (Folbergrova *et al.*, 1974 ; Hoyer et Krier, 1986) ce qui pourrait favoriser un retour des électrons du complexe II vers le I et donc participer à la forte production d'ERO dans ces conditions.

De façon très intéressante, une corrélation inverse entre la durée de vie et la production d' $H_2O_2$  par des mitochondries cardiaques utilisant du succinate chez les vertébrés homéothermes a été mise en évidence (Lambert *et al.*, 2007), ce qui sous-entend un rôle

très important de la production d'ERO induite par le retour des électrons dans le vieillissement des organismes.

### 3.3.2.2 Production par les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases forment une famille de complexes enzymatiques membranaires dont la fonction première est de catalyser le transfert d'électrons du NADPH à l'oxygène par leur sous-unité catalytique Nox, générant de l' $O_2^{\cdot -}$  et de l' $H_2O_2$ . Il existe 5 isoformes de Nox qui diffèrent par leur mode d'activation, leur localisation mais également par le type d'ERO qu'elles produisent. Ainsi, Nox 4 a été retrouvée au niveau des cardiomyocytes et a également été détectée au niveau des mitochondries cardiaques où elle se situerait à proximité de l'ATP synthase (Kuroda *et al.*, 2010).

Il existe d'importantes interactions entre les 2 principales sources d'ERO cellulaires. Les NADPH oxydases sont capables de stimuler la production mitochondriale d'ERO. En effet, l' $O_2^{\cdot -}$  et l' $H_2O_2$  sont capables d'activer les canaux  $mitoK_{ATP}$  (Queliconi *et al.*, 2011) ce qui entraîne une entrée de potassium dans la mitochondrie, causant ainsi une alcalinisation matricielle, un gonflement mitochondrial et une augmentation de la production mitochondriale d'ERO (Costa *et al.*, 2006b). De façon symétrique, une augmentation de production mitochondriale d'ERO est capable d'activer les NADPH oxydases mais le mécanisme de cette activation n'est pas clair. Ce dialogue entre les ERO mitochondriales et les NADPH oxydases joue probablement un rôle physiologique dans la signalisation redox de la cellule. En condition physiologique, la production d'ERO est spatialement restreinte dans des compartiments spécifiques. En revanche, une production excessive d'ERO dans des conditions pathologiques comme l'hypoxie induit un stress oxydant et transforme ce mécanisme en un cycle vicieux auto-entretenu ce qui pourrait contribuer au développement de conditions pathologiques.

### 3.3.2.3 Autres sources d'ERO

D'autres sources d'ERO sont également présentes dans l'organisme. Les ERO peuvent provenir de la xanthine oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique tout en réduisant l' $O_2$  en  $O_2^{\cdot -}$ . La détoxification des xénobiotiques par les cytochromes P450 peut également produire  $O_2^{\cdot -}$ . Cet  $O_2^{\cdot -}$  est alors pris en charge par les superoxydes dismutases cytosoliques ce qui génère  $H_2O_2$  qui est à l'origine de la formation de  $\cdot OH$ .



Les peroxysomes produisent aussi une grande quantité de  $H_2O_2$  qui est ensuite utilisée par la catalase peroxysomale pour peroxyder une grande variété de substrats. Ces réactions d'oxydation sont particulièrement importantes dans la détoxification de molécules dans certains tissus comme le foie et les reins mais également au cours de la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

### 3.3.3 Détoxification des ERO

Le maintien de la balance redox dans l'organisme est assuré par des systèmes antioxydants chargés de maintenir les ERO à un niveau non toxique et d'éliminer ou du moins de limiter les dommages qu'elles induisent. Ces systèmes peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques.

Parmi les systèmes enzymatiques, les principaux acteurs sont :

- la superoxyde dismutase (SOD) : elle catalyse la dismutation de  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ . Cette dismutation est spontanée à pH neutre et très rapide. Il existe 3 isoformes de SOD qui se différencient par leur localisation (cytosol/noyau, mitochondriale ou extracellulaire) et leur cofacteur métallique (Cu/Zn ou Mn) ;

- la catalase : elle catalyse la conversion de  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . Elle est localisée préférentiellement dans les peroxysomes mais est également présente dans le cytosol et les mitochondries ;

- les glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) : le glutathion existe sous forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG). L'équilibre du système est maintenu par la GPx et la GR. La GPx dismute  $H_2O_2$  en  $H_2O$  en oxydant deux GSH en un GSSG. La GR régénère ensuite le GSH à partir du GSSG en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans la mitochondrie.

D'autres systèmes de défenses non-enzymatiques participent également à la détoxification des ERO. Ce sont des molécules qui piègent ces ERO comme par exemple l'ubiquinone, le cytochrome c, les vitamines E et C ou encore l'acide urique.

### 3.3.4 Rôles dans l'hypertrophie myocardique et la cardioprotection

Les ERO sont des médiateurs cellulaires qui exercent des fonctions biologiques diversifiées. Elles jouent un rôle important dans les fonctions immunitaires, l'inflammation et la phagocytose mais participent également à différentes voies de transduction du signal en tant que médiateurs. Cependant lorsque l'équilibre redox est perturbé, les ERO peuvent s'accumuler et exercer des effets toxiques atteignant des cibles variées, ce qui explique la

diversité des pathologies dans lesquelles les ERO sont impliquées (cancer, maladies neurodégénératives, athérosclérose, diabète...). Elles sont également l'un des facteurs participant au vieillissement comme l'atteste l'accumulation de marqueurs de l'oxydation de biomolécules au cours du vieillissement.

Au niveau cardiovasculaire, le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies. Outre son rôle dans les lésions liées à l'ischémie-reperfusion myocardique, il semble être déterminant dans la survenue des cardiomyopathies et notamment dans l'hypertrophie myocardique dont la progression vers l'insuffisance cardiaque a été décrite dans de nombreuses études expérimentales mais aussi chez des patients présentant des sténoses aortiques ou des cardiomyopathies hypertrophiques familiales (Drazner, 2005). Différentes études expérimentales ont permis de mettre en évidence le rôle du stress oxydant dans le développement de l'hypertrophie myocardique. En effet, les ERO sont capables d'activer des kinases de signalisation et des facteurs de transcription impliqués dans la croissance cellulaire et le développement de l'hypertrophie, notamment la voie de signalisation des *Mitogen Activated Protein* (MAP) kinases (Aikawa *et al.*, 2001) et le facteur de transcription *Nuclear Factor Kappa-b* (NF- $\kappa$ B) (Zelarayan *et al.*, 2009). L'implication du stress oxydant dans l'hypertrophie myocardique a été confirmée par de nombreuses études rapportant un effet bénéfique d'un traitement antioxydant dans différents modèles expérimentaux. Ainsi, l'utilisation du tempol, un mime de SOD qui traverse les membranes, permet de bloquer le développement de l'hypertrophie sur des modèles de cardiomyocytes isolés traités par l'angiotensine II ou l'endothéline-1 (Laskowski *et al.*, 2006) ou sur des modèles animaux de souris invalidées pour le gène du transporteur au glucose GLUT-4 (Ritchie *et al.*, 2007).

Au cours de l'ischémie-reperfusion, il existe une production massive d'ERO qui peut entraîner des dommages cellulaires par peroxydation des lipides membranaires (cellulaires et mitochondriaux) et des protéines. Cependant, de nombreuses études ont démontré l'implication des ERO dans l'activation de différentes kinases de survie qui participent à l'effet cardioprotecteur. L' $H_2O_2$  est notamment capable d'induire une activation transitoire de la voie de cardioprotection *Reperfusion Injury Salvage Kinases* (RISK) qui se traduit par l'activation de la kinase Akt *via* sa phosphorylation par la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) (Pham *et al.*, 2000). Les ERO jouent également un rôle important dans l'effet cardioprotecteur induit par les conditionnements ischémiques (pré- et

post-conditionnement). Plusieurs études ont ainsi montré que ces stratégies induisent une production modérée d'ERO qui agissent comme médiateurs de leurs effets cardioprotecteurs en activant la protéine kinase C (PKC), ce qui aboutit à l'inhibition de l'ouverture du mPTP au début de la reperfusion (Baines *et al.*, 1997 ; Penna *et al.*, 2006). Cet effet serait lié à l'activation des canaux mitoK<sub>ATP</sub> (Costa *et al.*, 2006a).

### 3.4 NO et mitochondrie

Le NO est caractérisé par une grande diffusibilité à travers les membranes cellulaires et une réactivité limitée comparée aux autres espèces radicalaires. Sa demi-vie n'excède pas quelques secondes *in vivo*. Le NO présent dans l'organisme peut être endogène ou exogène provenant de la pollution atmosphérique ainsi que de la fumée de cigarette. Le NO exerce des effets régulateurs sur la plupart des grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Son rôle dans le système cardiovasculaire a été mis en évidence en 1980 par Furchgott et Zawadzki qui ont constaté que les cellules endothéliales synthétisaient une substance, d'abord baptisée *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) ayant des effets vasodilatateurs. Les groupes de recherche d'Ignarro (Ignarro *et al.*, 1987) et de Moncada (Palmer *et al.*, 1987) ont joué un rôle majeur dans l'étude de cette substance puisqu'en 1987 deux publications montraient des similitudes entre les effets de l'EDRF et du NO, concluant que l'EDRF n'est autre que le NO. Cette découverte des effets du NO sur le système cardiovasculaire est la première démonstration du pouvoir régulateur d'un gaz sur l'organisme en tant qu'agent de communication entre les cellules et fit l'objet du Prix Nobel de Médecine en 1998 attribué à Furchgott, Ignarro et Murad pour avoir, respectivement, mis en évidence la production d'une substance à potentiel vasodilatateur par les cellules endothéliales : l'EDRF, démontré que l'effet vasodilatateur de l'EDRF est dû au NO et enfin identifié l'enzyme cytosolique guanylate cyclase comme cible du NO dans le système cardiovasculaire (Arnold *et al.*, 1977).

Le NO est donc une molécule clé de la signalisation cellulaire (Moncada *et al.*, 1991) et la mitochondrie représente une cible importante de ses effets.

#### 3.4.1 Synthèse du NO

Le NO est synthétisé lors de la transformation enzymatique de la L-arginine en L-citrulline grâce à une famille d'enzymes héminiques : les NO synthases. La L-arginine est d'abord hydroxylée pour former un composé instable, la N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine qui est ensuite oxydée en L-citrulline induisant au passage la libération du NO (figure 10).

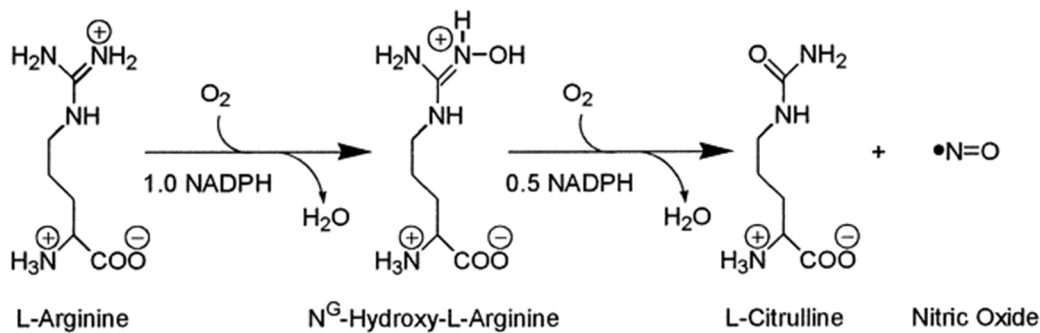


Figure 10 : Synthèse du NO par les NOS. La L-Arginine est hydroxylée en N<sup>ω</sup>-hydroxy-L-arginine ensuite oxydée en L-citrulline ce qui libère du NO. NADPH, Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite.

Le NO peut également être généré de façon non enzymatique *in vivo* lors de la réduction du nitrite NO<sub>2</sub><sup>-</sup> qui a lieu lorsque le pH est inférieur à 5. Un tel pH peut être retrouvé dans des conditions ischémiques notamment (Zweier *et al.*, 1999).

Les NOS sont des métalloenzymes dimériques possédant un groupement hémique. Il en existe trois isoformes qui diffèrent par leur localisation (cytosolique ou membranaire), leurs propriétés catalytiques, leur caractère constitutif ou inducible et leur mode de régulation. Il s'agit de la *endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS), la *neuronal Nitric Oxide Synthase* (nNOS) et de la *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) (Stuehr, 1999). La eNOS et la nNOS sont constitutives, c'est-à-dire qu'elles produisent continuellement de faibles quantités de NO et ne sont limitées que par la disponibilité des substrats et des cofacteurs. Ces protéines présentent de nombreuses similitudes. Structurellement, chaque monomère possède un domaine oxydase N-terminal et un domaine réductase C-terminal liés par l'intermédiaire d'un complexe Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline (CaM). Le domaine oxydase contient les sites de fixation pour l'hème, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et la L-arginine. Le domaine réductase est quant à lui constitué des sites de fixation pour la FMN, le FAD et le NADPH. Les électrons issus du NADPH sont transférés à l'hème *via* la FMN puis le FAD. Toutes les NOS sont actives sous forme dimérique, utilisent le même substrat (L-arginine), ont besoin des mêmes cofacteurs (hème, NADPH, BH<sub>4</sub>, FMN, FAD) et possèdent des analogies de structure et de fonctionnement avec le cytochrome P<sub>450</sub> (Alderton *et al.*, 2001 ; Groves et Wang, 2000).

#### 3.4.1.1 La nNOS

La NOS neuronale (nNOS ou NOS 1) est la première isoforme de NOS à avoir été caractérisée au niveau du tissu cérébral (Bredt *et al.*, 1990). Elle est constitutive et

prédomine dans le cytosol des cellules du système nerveux central et périphérique et a depuis été retrouvée dans de nombreux autres tissus dont l'endothélium (Calignano *et al.*, 1992).

Le NO produit par la nNOS se comporte comme un neurotransmetteur et joue également un rôle dans la relaxation des muscles lisses des tractus gastro-intestinal, respiratoire et génito-urinaire ainsi que dans le tonus des muscles squelettiques *via* l'activation des guanylates cyclases et la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui agit comme messenger secondaire.

L'activation de nNOS est dépendante de la présence de  $Ca^{2+}$  puisque la nNOS n'est active qu'après son association au complexe  $Ca^{2+}/CaM$  qui permet sa translocation depuis la membrane dans le cytosol et la déphosphorylation de la nNOS par la calcineurine induit la formation de NO.

#### 3.4.1.2 La iNOS

La NOS inductible (iNOS ou NOS 2) est la deuxième isoforme à avoir été identifiée. Elle est cytosolique et génère du NO en grande quantité et de façon continue en réponse à un stimulus inflammatoire. Si la présence de  $Ca^{2+}$  est nécessaire à son activation, la concentration requise est bien moindre que pour les autres NOS et n'est donc pas limitante. Elle est présente dans le cytosol des macrophages mais peut également être exprimée dans la majorité des types cellulaires en réponse à un stress inflammatoire. Une sur-expression de la iNOS a également été retrouvée dans plusieurs pathologies telles que l'obésité (Perreault et Marette, 2001) ou l'hypertension artérielle (Wu *et al.*, 1996).

L'expression de la iNOS est induite par l'action de produits bactériens comme les lipopolysaccharides ou des cytokines pro-inflammatoires (Interferon- $\gamma$ ,  $TNF\alpha$ , Interleukine-1) ou encore par les ERO. Le mécanisme de cette activation fait intervenir le facteur de transcription NF- $\kappa B$  (MacMicking *et al.*, 1997). Le NO produit exerce un rôle cytotoxique vis-à-vis des pathogènes en inhibant directement des enzymes impliquées dans le métabolisme glucidique (aldolase), le cycle de Krebs (aconitase), la respiration mitochondriale (cytochrome c oxydase) et la synthèse d'ADN (ribonucléotide réductase). Le NO peut également réagir avec des ERO pour former d'autres espèces cytotoxiques ( $NO_2$ ,  $N_2O_3$ , HONO, ONOO $\cdot$ ).

#### 3.4.1.3 La eNOS

La NOS endothéliale (eNOS ou NOS 3) est présente, associée à la membrane plasmique ou à l'appareil de Golgi, dans de nombreux types cellulaires et notamment au niveau des cavéoles des cellules endothéliales. Tout comme la nNOS, la eNOS est constitutive et est activée par la présence du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . La eNOS intervient dans la régulation de l'homéostasie vasculaire. Le NO synthétisé par la eNOS en réponse à une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne l'activation des guanylates cyclases solubles et la synthèse du GMPc, ce qui aboutit à un relâchement musculaire lisse, une vasodilatation, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion leucocytaire.

#### 3.4.1.4 La mtNOS

L'existence d'une NOS mitochondriale (mtNOS) a été décrite dans plusieurs études basées sur des techniques d'immuno-histochimie (Bates *et al.*, 1995, 1996 ; Kobzik *et al.*, 1995) mais elle reste controversée. Des études ont cependant montré l'existence d'une production de NO par des mitochondries isolées et purifiées (Elfering *et al.*, 2002 ; Giulivi *et al.*, 1998). Cette production nécessite de la L-arginine, est sensible à la présence d'un inhibiteur des NOS (le  $\text{N}^{\omega}$ -monométhyl-L-arginine ou L-NMMA) et est principalement localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale. Tatoyan et Giulivi (1998) ont purifié la mtNOS à partir de mitochondries isolées de foie de rat, ce qui a permis de montrer que cette NOS présente des similitudes avec la iNOS, notamment au niveau de ses paramètres cinétiques, de son poids moléculaire, des cofacteurs nécessaires à son activation et de sa réactivité avec des anticorps monoclonaux anti iNOS. En revanche, d'autres auteurs ont souligné que cette mtNOS est constitutivement active et que son activité dépend du  $\text{Ca}^{2+}$  comme la eNOS et la nNOS (Ghafourifar et Richter, 1997). Enfin, une étude sur des souris invalidées pour la nNOS a mis en évidence une absence de production de NO au niveau des mitochondries cardiaques de ces animaux, ce qui n'est pas le cas pour des animaux invalidés pour la iNOS ou la eNOS (Kanai *et al.*, 2001). L'ensemble de ces données indique que la mtNOS est en réalité une nNOS, du moins au niveau myocardique, ce qui a ensuite été confirmé par la caractérisation biochimique de l'enzyme isolée. La production mitochondriale de NO pourrait être impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique, de la fonction respiratoire mitochondriale ainsi que dans la production des ERO.

### 3.4.2 Effets mitochondriaux du NO

Le NO et ses dérivés ont de multiples effets sur la mitochondrie qui impactent la physiologie cellulaire. Les mitochondries produisent et consomment du NO et le NO est capable de stimuler la biogenèse mitochondriale. Il est capable d'inhiber la respiration mitochondriale en interagissant avec la chaîne respiratoire à différents niveaux. D'une part, le NO lui-même induit une inhibition puissante, rapide mais réversible de la cytochrome c oxydase par compétition avec l'oxygène et d'autre part les espèces réactives de l'azote (peroxynitrite, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et les S-nitrosothiols) causent une inhibition faible, lente mais irréversible (ou lentement réversible) de nombreux composants mitochondriaux.

#### 3.4.2.1 Inhibition de la cytochrome c oxydase

Le NO entraîne une inhibition rapide mais réversible de la cytochrome c oxydase à des concentrations nanomolaires (Brown et Cooper, 1994 ; Cleeter *et al.*, 1994) ce qui en fait un régulateur physiologique probable de la respiration mitochondriale. Le NO inhibe la cytochrome c oxydase au niveau du centre binucléaire en se fixant à l'un ou l'autre des composants du site de fixation de l'O<sub>2</sub> (voir paragraphe 3.1.1.4). Le NO a la capacité de se lier à la forme réduite de l'hème a<sub>3</sub> pour former des adduits Fe<sup>2+</sup>-NO (Giuffrè *et al.*, 1996) ou à la forme oxydée du Cu<sub>B</sub> pour donner des dérivés nitrés Cu<sub>B</sub><sup>+</sup>-NO<sup>+</sup>, le NO<sup>+</sup> pouvant rapidement donner du nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) par une réaction d'hydratation (Torres *et al.*, 1995). La première forme d'inhibition est photosensible et compétitive, contrairement à la seconde photoinsensible et non-compétitive, ce qui a permis d'étudier la voie d'inhibition prédominante *in vivo* et de montrer que le flux d'électrons au travers de la cytochrome c oxydase détermine la prévalence d'un mécanisme par rapport à l'autre (Sarti *et al.*, 2000). Ainsi, lorsque le flux d'électrons est élevé et donc que le niveau de réduction du cytochrome c est élevé, la fixation du NO sur la forme réduite de l'hème a<sub>3</sub> semble prédominante tandis qu'à flux d'électrons faible, l'inhibition est principalement causée par la formation de nitrite formant des adduits avec le centre binucléaire oxydé.

L'inhibition observée sur des cellules traitées par des donneurs de NO ou sur-exprimant la iNOS est sensible à la lumière et compétitive avec l'O<sub>2</sub>, ce qui semble indiquer qu'en conditions physiologiques la liaison du NO avec l'hème a<sub>3</sub> serait prédominante alors qu'en situations pathologiques (inhibition de la chaîne respiratoire par exemple), ce serait l'inverse.

Indépendamment de son effet direct sur la cytochrome c oxydase, le NO (ainsi que ses dérivés) est capable d'induire une inhibition persistante de ce complexe par des modifications protéiques, notamment par des S-nitrosations (addition d'un groupe NO à un résidu thiol) de la sous-unité II de celle-ci (Zhang *et al.*, 2005).

#### 3.4.2.2 Autres cibles mitochondriales du NO

Les autres complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent également être inhibés par le NO ou ses dérivés, mais cette inhibition est moins puissante quoique plus durable.

Ainsi, le complexe I est inhibé par le NO, le peroxy-nitrite et les S-nitrosothiols selon différents mécanismes qui ne sont pas parfaitement caractérisés. L'inhibition peut être réversible à la lumière ou en présence de thiols réduits et ferait alors intervenir des S-nitrosations ou des Fe-nitrosylations (Brown et Borutaite, 2004). Il existe également une inhibition irréversible par le peroxy-nitrite et d'autres oxydants à de fortes concentrations de NO qui ferait intervenir des nitrations de tyrosines, l'oxydation de résidus ou des dommages des centres Fe-S.

Le complexe II est relativement insensible au NO ou à ses dérivés mais les centres Fe-S qu'il contient peuvent être endommagés, voire détruits, par de fortes concentrations de NO *via* la formation de complexes NO-Fe ce qui induit son inhibition de manière irréversible (Cassina et Radi, 1996 ; Welter *et al.*, 1996).

Le complexe III est également inhibé par de fortes concentrations de NO mais ici de façon réversible. Cependant le mécanisme d'action de cet effet n'est pas totalement élucidé.

Le NO et ses dérivés ont aussi de nombreux autres effets au niveau mitochondrial ce qui peut impacter la production d'énergie. Ainsi, les peroxy-nitrites, qui sont formés par réaction très rapide du NO avec l' $O_2^-$ , peuvent inhiber l'aconitase qui est une enzyme du cycle de Krebs (Gardner *et al.*, 1997) ainsi que l'ATP synthase. La créatine kinase mitochondriale qui participe à l'exportation de l'ATP depuis les mitochondries est inhibée par les S-nitrosothiols (Gross *et al.*, 1996). Peroxy-nitrites et S-nitrosothiols peuvent également induire une perméabilisation des membranes mitochondriales qui semble impliquer l'ouverture du mPTP (Packer et Murphy, 1994). Inversement, l'étude des voies de signalisation impliquées dans la protection du myocarde ischémié a permis de montrer que le NO diminue la probabilité d'ouverture du mPTP en activant la guanylate cyclase, la protéine kinase G et l'ouverture du  $mitoK_{ATP}$  (Costa *et al.*, 2005).



Le NO est également capable de stimuler la biogenèse mitochondriale *via* l'action du GMPc et l'augmentation de l'expression des facteurs de transcriptions PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 et mtTFA, ce qui aboutit à une augmentation de l'expression des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Clementi et Nisoli, 2005).

## Chapitre 2 : Mitochondrie et cardioprotection

Ces dernières années ont permis de mettre en évidence un rôle central de la mitochondrie dans la régulation de la mort cellulaire dans diverses pathologies et notamment lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion.

### **1 Altérations mitochondriales liées à l'ischémie-reperfusion**

Le maintien de la fonction contractile du myocarde nécessite un apport énergétique important alors que le coeur contient très peu de réserve énergétique. Ce dernier fonctionne donc en « flux tendu », approvisionné par le flux sanguin coronaire en O<sub>2</sub> et en nutriments. L'ischémie résulte alors d'un déséquilibre entre consommation et apport en oxygène du myocarde, en général causée par l'obstruction du flux coronaire. Ceci aboutit *in fine* à une chute de la production énergétique par les mitochondries entraînant une accumulation excessive d'ions et de métabolites. Ces modifications ioniques et métaboliques provoquent une réduction de la fonction contractile du myocarde et si le flux coronaire n'est pas rétabli rapidement, elles induisent des dommages qui s'amplifient avec la durée de l'ischémie. Le rétablissement du flux sanguin, ou reperfusion, est nécessaire pour interrompre la progression des lésions. Cependant il est maintenant bien établi que cette reperfusion entraîne également des dommages cellulaires propres qui se surajoutent à ceux causés par l'ischémie. Ces dommages sont appelés « lésions de reperfusion » et peuvent induire la mort des cardiomyocytes. La dysfonction mitochondriale (résumée figure 11) joue un rôle majeur dans la pathogenèse de l'ischémie-reperfusion myocardique (Yellon et Hausenloy, 2007)

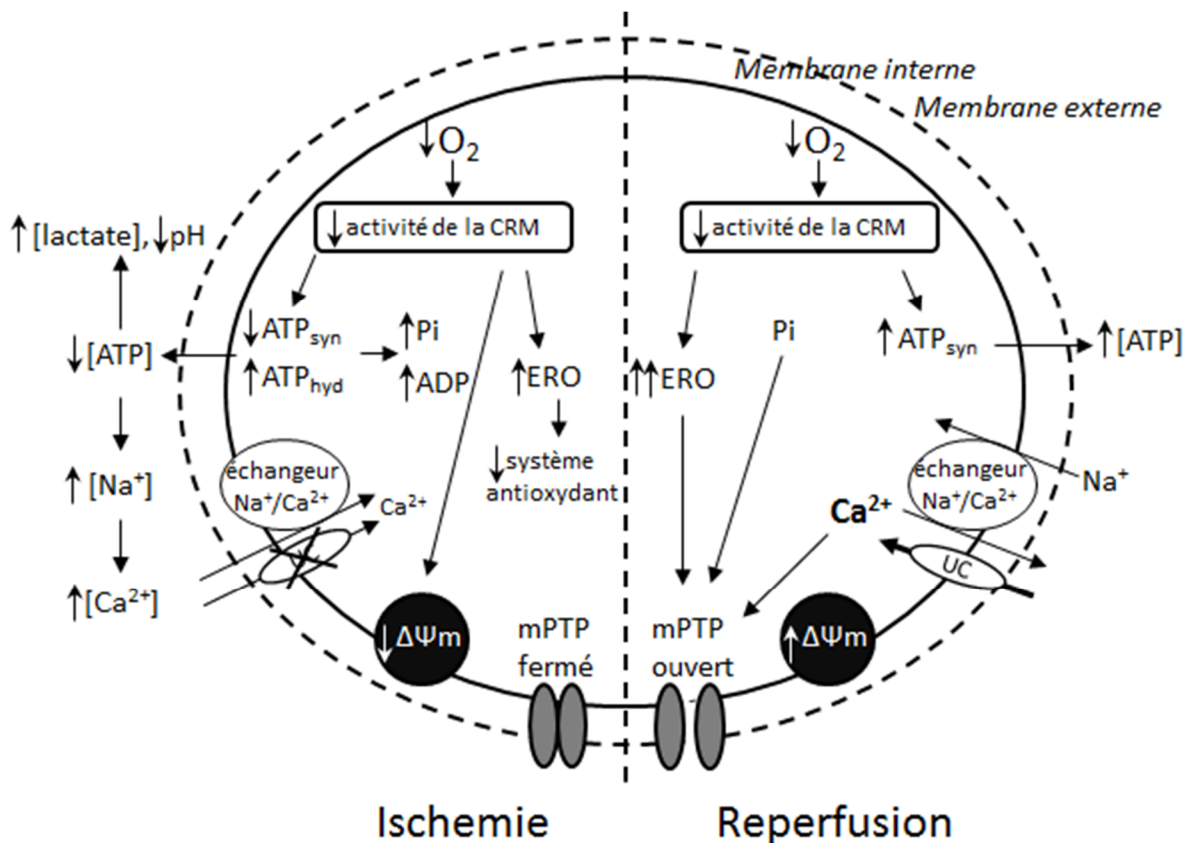


Figure 11 : Altérations mitochondriales et cytosoliques se produisant lors de l'ischémie-reperfusion myocardique (d'après Morin *et al.*, 2009). Ce schéma illustre la relation qui existe entre le taux d'O<sub>2</sub>, la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) par la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), l'accumulation de Ca<sup>2+</sup>, la production d'espèces réactives de l'O<sub>2</sub> (ERO) et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) lors d'une ischémie-reperfusion. ADP, adénosine diphosphate ; ATP<sub>syn</sub>, synthèse d'ATP ; ATP<sub>hyd</sub>, hydrolyse d'ATP ; Pi, phosphate inorganique ; UC, uniporteur calcique mitochondrial ; ΔΨ<sub>m</sub>, potentiel de membrane mitochondrial.

### 1.1 Dysfonctionnements mitochondriaux consécutifs à l'ischémie

Les dommages ultrastructuraux et fonctionnels mitochondriaux apparaissent précocement et progressent avec la durée de l'ischémie.

#### 1.1.1 Perte de la fonction mitochondriale pendant l'ischémie

L'ischémie a un effet immédiat sur la production d'énergie par la mitochondrie. En effet, la carence brutale en oxygène entraîne un arrêt de la phosphorylation oxydative et une chute du ΔΨ<sub>m</sub>, inhibant de ce fait la synthèse aérobie de l'ATP. L'ATP synthase hydrolyse alors l'ATP pour maintenir le potentiel de membrane mitochondrial, ce qui participe à la déplétion de l'ATP. Le contenu cellulaire en créatine phosphate est rapidement

consommé et la concentration en Pi augmente dans la cellule. La production anaérobie d'ATP par la glycolyse est dans un premier temps stimulée mais l'absence de flux sanguin entraîne une accumulation des produits de la glycolyse tels que l'acide lactique et les protons ce qui aboutit à une diminution du pH intracellulaire. Cette acidification inhibe la glycolyse aggravant ainsi la déplétion cellulaire d'ATP. Cette diminution du pH intracellulaire protège cependant les cardiomyocytes de la mort cellulaire lors de l'ischémie et dans les premiers instants de la reperfusion.

### 1.1.2 Modification de l'homéostasie calcique

Lors de l'ischémie, on observe une forte augmentation de la concentration calcique cytosolique. En effet, l'absence d'ATP et l'augmentation de Pi inhibent la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Kupriyanov *et al.*, 1996) et le  $\text{Na}^+$  s'accumule dans le cardiomyocyte en pénétrant par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  qui en temps normal expulse le  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule fonctionne alors en sens inverse ce qui entraîne une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. La mitochondrie a la capacité d'emmagasiner d'importantes quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gunter et Pfeiffer, 1990) mais ce processus est limité lors de l'ischémie car la diminution du potentiel de membrane mitochondrial inhibe l'uniporteur  $\text{Ca}^{2+}$ , principale voie d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Cependant, le  $\text{Ca}^{2+}$  peut entrer *via* l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  qui fonctionne en mode inverse lorsque la surcharge calcique cytosolique est importante (Griffiths *et al.*, 1998).

### 1.1.3 Génération d'ERO

L'idée d'une production d'ERO lors de l'ischémie peut paraître contre-intuitive étant donné que l' $\text{O}_2$  se raréfie pendant l'ischémie ; elle a toutefois été mise en évidence dans plusieurs études (Becker *et al.*, 1999 ; Robin *et al.*, 2007). La génération d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  dépend du niveau d'oxygène mais également de la présence de flavines ou de quinones sous forme réduite. Les flavines et les quinones réduites augmentent la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  à de faibles concentrations d' $\text{O}_2$  (Misra et Fridovich, 1972). Or, lors de l'ischémie, le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire est fortement ralenti ce qui accroît l'état de réduction des transporteurs d'électrons favorisant la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  tant que l' $\text{O}_2$  est disponible. Bien que l'amplitude de ce stress oxydant à l'ischémie soit suffisant pour diminuer le rapport glutathion réduit sur glutathion oxydé (GSH : GSSG), la mort cellulaire avant la reperfusion reste relativement faible (Vanden Hoek *et al.*, 1996) ce qui indique que ces ERO ne sont pas délétères. Ils participent cependant à la régulation de la mort cellulaire pendant la

reperfusion puisque, lorsque leur production est inhibée par l'ajout d'un antioxydant seulement à l'ischémie ou par la séquestration de l'O<sub>2</sub> résiduel durant l'ischémie, la mort cellulaire à la reperfusion est inhibée (Robin *et al.*, 2007). De plus, ils sont nécessaires à l'induction de l'ouverture du mPTP qui a lieu à la reperfusion (Assaly *et al.*, 2012). Ces ERO produits à l'ischémie diminuent la capacité antioxydante des cardiomyocytes, notamment en diminuant la Mn-SOD mitochondriale et le glutathion réduit cellulaire, ce qui est une cause majeure de lésions de reperfusion (Ferrari *et al.*, 1993).

#### 1.1.4 Altérations de la chaîne respiratoire mitochondriale

Au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, les premiers dommages liés à l'ischémie sont observés au niveau du complexe I. Son activité diminue pendant l'ischémie et ceci est lié à la diminution de la composante NADH déshydrogénase de ce complexe qui pourrait être due à la perte de la flavine mononucléotide (Rouslin et Ranganathan, 1983). L'oxydation de la cardiolipine semble également jouer un rôle important dans les dommages ischémiques du complexe I puisque la cardiolipine est nécessaire au transfert des électrons au sein de ce complexe et que l'ischémie diminue le contenu en cardiolipine dans la membrane interne mitochondriale (Paradies *et al.*, 2004). Au niveau de l'appareil de phosphorylation, l'ANT et l'ATP synthase sont également touchées précocement lors de l'ischémie.

Les dommages ischémiques progressent ensuite pour atteindre le complexe III et le complexe IV. Comme pour le complexe I, l'ischémie diminue l'activité des complexes III et IV. Au niveau du complexe III, l'ischémie altère la conformation de la protéine de Rieske ce qui perturbe l'intégrité du centre Fer-Soufre sans modification de la séquence peptidique de cette sous-unité (Lesnefsky *et al.*, 2001a). Tout comme pour le complexe I, l'oxydation de la cardiolipine qui est également essentielle au fonctionnement du complexe III, semble jouer un rôle majeur dans l'atteinte du complexe III (Petrosillo *et al.*, 2003).

Les sous-unités catalytiques, régulatrices et structurales du complexe IV ne semblent pas être touchées par l'ischémie (Lesnefsky *et al.*, 1997). Cependant, le complexe IV requiert un environnement lipidique enrichi en cardiolipine pour que son activité soit optimale. Or, dans un modèle d'ischémie myocardique sur cœur isolé-perfusé de lapin, une étude a montré que l'ischémie entraînait une diminution de cardiolipine concomitante de la diminution de l'activité du complexe IV (Lesnefsky *et al.*, 2001b). Les dommages ischémiques de la cardiolipine sont spécifiques puisque les autres phospholipides sont préservés pendant

l'ischémie. La cardiolipine est particulièrement sensible à la peroxydation du fait, d'une part de sa richesse en acides gras insaturés et, d'autre part de sa localisation dans la membrane mitochondriale proche des sources d'ERO mitochondriales, ce qui explique qu'elle puisse être atteinte lors de l'ischémie.

## 1.2 Dysfonctionnement mitochondrial lié à la reperfusion

La reperfusion entraîne la réintroduction brutale de l'oxygène dans les tissus ischémiques et donc la reprise d'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale qui a été endommagée lors de l'ischémie. La récupération de la fonction mitochondriale dépend de la sévérité et de la durée de l'ischémie : si cette durée est suffisante pour endommager les complexes III et IV, la phosphorylation oxydative se détériore pendant la reperfusion et aggrave les dysfonctionnements mitochondriaux (Veitch *et al.*, 1992).

### 1.2.1 Aggravation de la surcharge calcique

A la reperfusion, les transporteurs calciques reprennent leur sens de fonctionnement classique. La reprise de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale permet la restauration du potentiel de membrane (du moins dans un premier temps) (Di Lisa *et al.*, 1995) ce qui permet la réactivation de l'uniporteur  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci aboutit à une exacerbation de la surcharge calcique (Ferrari *et al.*, 1993) et à une augmentation de la perméabilité membranaire (Crompton, 1999).

### 1.2.2 Dommages oxydants

La reprise de l'activité des complexes respiratoires, endommagés lors de l'ischémie, provoque une production massive d'ERO dans les premières minutes de la reperfusion. La grande majorité des ERO produits à la reperfusion provient des complexes I et III. La plupart des transporteurs d'électrons sont hautement réduits après une ischémie ce qui facilite la génération d' $\text{O}_2^-$  lorsque l' $\text{O}_2$  revient dans la cellule. Le site majoritaire de production des ERO à la reperfusion est probablement l'ubiquinone. En effet, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale en absence d' $\text{O}_2$  induit la réduction partielle d'ubiquinone en ubisemiquinone qui interagit avec l' $\text{O}_2$  à la reperfusion pour produire massivement de l' $\text{O}_2^-$ . Cette surproduction d' $\text{O}_2^-$  intervient alors que les défenses antioxydantes ont été affaiblies pendant l'ischémie avec notamment une diminution de l'activité MnSOD. L' $\text{O}_2^-$  peut donc réagir avec le NO pour produire du  $\text{ONOO}^-$ , une molécule très réactive, ce qui peut aboutir à la nitration de protéines.

L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut également réagir avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour produire <sup>•</sup>OH. <sup>•</sup>OH peut aussi être formé *via* la réaction de Fenton du fait, d'une part de la diminution de GSH pendant l'ischémie qui limite la conversion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et, d'autre part de l'augmentation du fer au cours de l'ischémie (Coudray *et al.*, 1994) qui facilite la réaction de Fenton (Jassem et Heaton, 2004 ; Zweier et Talukder, 2006). <sup>•</sup>OH est l'espèce prédominante dans les lésions cellulaires précoces de la reperfusion (Das *et al.*, 1989). Cependant, une étude a montré que si les dommages mitochondriaux sont trop sévères et que la consommation d'O<sub>2</sub> mitochondriale est atteinte, la production d'<sup>•</sup>OH à la reperfusion est inhibée (Otani *et al.*, 1984).

Les autres systèmes producteurs d'ERO (NADPH oxydase, xanthine oxydase, NOS) participent également à cette production massive d'ERO à la reperfusion (Turrens, 2003).

Ces ERO produites en grande quantité au moment de la reperfusion dépassent la capacité antioxydante de la cellule et ont de nombreux effets délétères. Ainsi, elles agissent directement au niveau des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et plus spécifiquement au niveau du complexe I mais également au niveau du complexe III, de l'ATP synthase ou de l'ANT, ce qui accentue la réduction de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et la diminution de la synthèse d'ATP. Ces ERO endommagent également les lipides membranaires ce qui fragilise les membranes et augmente notamment la perméabilité de la membrane interne aboutissant également à une diminution de la synthèse de l'ATP. Le stress oxydant à la reperfusion est également associé à des dommages au niveau de l'ADN mitochondrial. L'ensemble de ces dommages supplémentaires aggravent l'altération de la fonction mitochondriale et mènent à la mort cardiomyocytaire.

### 1.3 Perméabilisation des membranes mitochondriales

L'imperméabilité de la membrane interne aux ions est indispensable pour la phosphorylation oxydative et donc à la survie cellulaire. Un stress majeur, tel que l'ischémie-reperfusion, peut entraîner la perméabilisation des membranes mitochondriales. C'est l'un des événements terminaux conduisant à la mort cellulaire. Deux mécanismes différents et non exclusifs ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier implique la participation des membranes internes et externes et correspond à l'ouverture du mPTP tandis que le second implique la membrane externe et la formation de canaux à travers cette membrane.

### 1.3.1 Ouverture du mPTP

Après un stress ischémique, la perméabilité de la membrane peut être altérée à cause de l'ouverture d'un pore voltage-dépendant et non spécifique appelé pore de transition de perméabilité mitochondriale ou mPTP qui est un complexe multiprotéique capable de former un pore non sélectif au niveau des zones de contact des membranes internes et externes (Crompton, 1999). La composition moléculaire exacte de ce pore reste encore incertaine et plusieurs modèles ont été proposés. Ainsi Javadov et Karmazyn (2007) ont proposé que l'ANT qui est située dans la membrane interne mitochondriale et modulée par la peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ou cyclophiline D, serait associée au VDAC localisé dans la membrane externe pour former le canal transmembranaire (figure 11). D'autres protéines comme la créatine kinase, l'hexokinase II, les protéines de la famille Bcl-2 et la protéine translocatrice mitochondriale (TSPO) seraient des composants régulateurs. Un autre modèle décrit par Leung et Halestrap (2008) suggère que le PiC formerait le canal tandis que l'ANT et la cyclophiline D réguleraient son ouverture (figure 12). Dernièrement, un nouveau modèle (figure 13) suggère que le mPTP serait un dimère d'ATP synthase (Bernardi, 2013 ; Giorgio *et al.*, 2013).

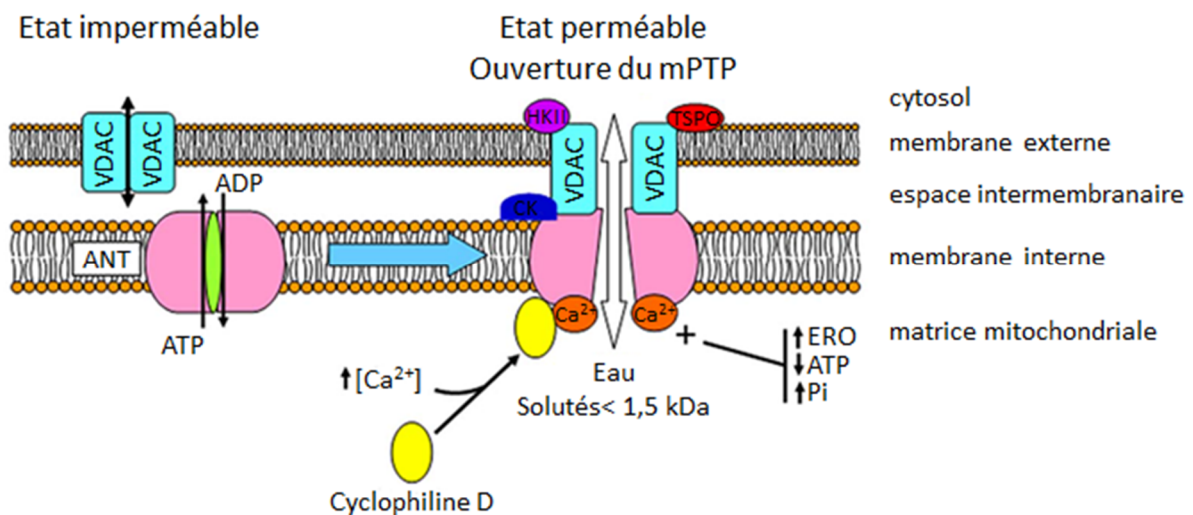


Figure 12 : Modèle de mPTP proposé par Javadov et Karmazyn (2007). L'ouverture du mPTP est induite lorsque les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et le phosphate inorganique (Pi) sont augmentés et lorsque l'adénosine triphosphate (ATP) est diminué, permettant un échange de molécules (<1,5 kDa) et d'ions entre le cytoplasme et la mitochondrie. Les composants majeurs du mPTP sont l'*adenine nucleotide translocator* (ANT), la cyclophiline D et le voltage-dépendent anion channel (VDAC). La protéine translocatrice mitochondriale (TSPO), la créatine kinase (CK), l'hexokinase II (HKII) semblent jouer un rôle régulateur. ADP : adénosine diphosphate.



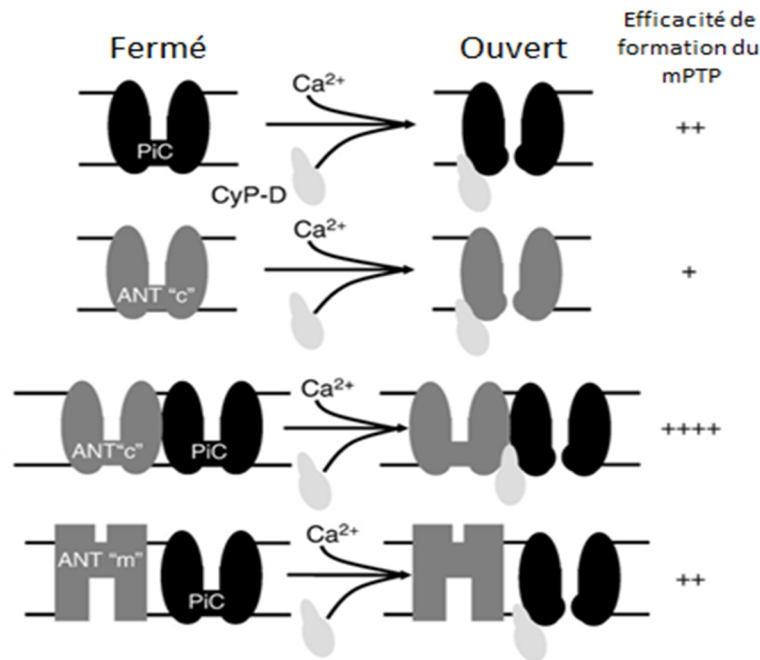


Figure 13 : Modèle de mPTP proposé par Leung et Halestrap (2008). Le composant principal du pore est le transporteur de phosphate (PiC) plutôt que l' *adenine nucleotide translocator* (ANT) mais la liaison de l'ANT en conformation « c » avec le PiC améliore la formation d'un pore. La formation d'un pore par l'ANT seule n'est pas exclue mais reste relativement moins efficace comparée à celle faisant entrer en jeu le PiC. Le changement de conformation du PiC (ou de l'ANT) responsable de la formation d'un pore est facilitée par la cyclophiline-D (CyP-D) mais peut également se produire en absence de celle-ci lorsque les concentrations calciques sont très élevées. La liaison de nucléotides adényliques à l'ANT préviendrait son interaction avec le PiC et la formation du pore.

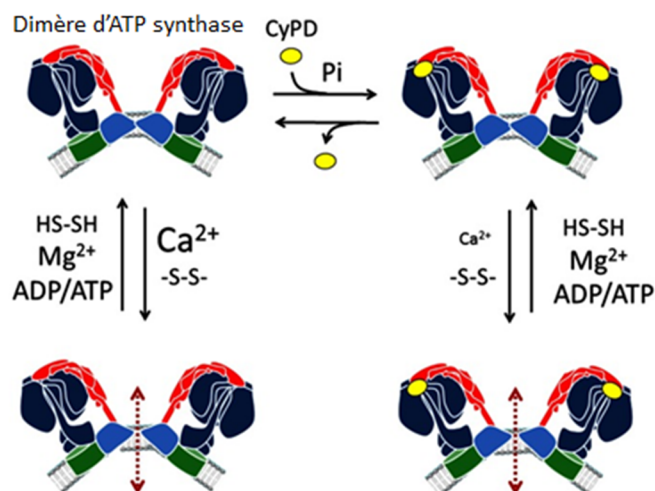


Figure 14 : Modèle de mPTP proposé par Bernardi (2013). Les dimères d'ATP synthase peuvent former le mPTP lorsque du  $\text{Ca}^{2+}$  plutôt que du  $\text{Mg}^{2+}$  se lie au niveau du site catalytique. La liaison de la cyclophyline D (CyPD) est favorisée par le Pi ce qui augmenterait l'accessibilité des sites catalytiques et favoriserait la formation du mPTP à de plus faibles concentrations calciques. Les nucléotides adényliques préviennent la formation du mPTP en synergie avec le  $\text{Mg}^{2+}$ .

Quel que soit le modèle, le mPTP s'ouvre en présence de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et cette sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  est fortement exacerbée par la déplétion en nucléotides adényliques, de fortes concentrations en Pi et surtout par un stress oxydant (Di Lisa et Bernardi, 2009 ; Halestrap, 2009). De telles conditions sont celles retrouvées au moment de la reperfusion. Lors de l'ischémie, l'acidose cellulaire prévient l'ouverture du mPTP mais la normalisation du pH intracellulaire induite par la reperfusion lève cette inhibition.

L'ouverture du mPTP a deux conséquences qui jouent un rôle majeur dans la mort cardiomyocytaire. La première est le découplage de la phosphorylation oxydative, causée par l'augmentation de la perméabilité aux protons, et qui entraîne la dissipation de la force motrice et du potentiel de membrane. La seconde est le gonflement de la mitochondrie dû à l'entrée d'osmolytes de faible poids moléculaire. Comme la concentration matricielle en protéines est très élevée, une pression osmotique importante s'instaure, l'eau entre dans la matrice et induit le gonflement mitochondrial. L'intégrité de la membrane interne n'est pas menacée par le gonflement de la matrice puisque les crêtes mitochondriales peuvent se déplier ; cependant l'expansion matricielle exerce une pression sur la membrane externe qui peut alors se rompre. Ceci cause la libération de cytochrome c et d'autres protéines pro-apoptotiques dans le cytosol.

Ces deux événements aboutissent à l'arrêt de la synthèse d'ATP et l'ATP synthase hydrolyse alors l'ATP provenant de la glycolyse ou d'éventuelles mitochondries non atteintes. En conséquence, les cardiomyocytes contenant un nombre important de mitochondries dont le mPTP est ouvert ne peuvent maintenir leur niveau d'ATP et l'altération du métabolisme et de l'homéostasie ionique en découlant mène à la mort cellulaire par nécrose. Par contre, si l'ouverture du mPTP est transitoire et que la synthèse d'ATP reste suffisante, la libération des facteurs proapoptotiques induit la mort cellulaire par apoptose (Halestrap et Pasdois, 2009 ; Nieminen, 2003 ; Weiss *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Perméabilisation de la membrane externe

La libération du cytochrome c peut également se produire en absence de dépolarisation de la membrane et sans perte d'intégrité de la membrane externe. Cette libération est provoquée par une perméabilisation sélective de la membrane externe du fait de l'ouverture d'un pore et non d'une rupture brutale de celle-ci. Ce pore a été appelé *mitochondrial apoptosis induced channel* (MAC) et la protéine pro-oncogène Bax serait l'un des composants essentiels de ces canaux MAC (Kinnally et Antonsson, 2007). Lors de

l'ischémie-reperfusion, Bax initialement cytosolique, est activée ce qui provoque sa migration vers la mitochondrie où elle s'insère dans la membrane externe (Capano et Crompton, 2006). La formation de ces canaux augmente la perméabilité membranaire, favorise la libération de cytochrome c et donc participe à la transmission du signal apoptotique. Bax jouerait également un rôle dans la régulation de l'ouverture du mPTP en interagissant avec VDAC (Shimizu et Tsujimoto, 2000).

## **2 La mitochondrie, cible privilégiée des stratégies cardioprotectrices**

Si la mitochondrie est trop fortement endommagée lors de la reperfusion, la synthèse de l'ATP nécessaire au bon fonctionnement de la cellule n'est plus assurée et cela peut entraîner la mort cellulaire. Cependant, si la mitochondrie peut être protégée lors de ce moment critique, la balance peut alors pencher en faveur du côté des dommages réversibles et de la réparation de la cellule plutôt que du côté des lésions irréversibles et de la mort cellulaire. Les différentes stratégies dites « cardioprotectrices » développées à ce jour agissent en ciblant directement ou indirectement la mitochondrie mais aboutissent toutes à une limitation de l'augmentation de la perméabilité membranaire (Morin *et al.*, 2009).

### 2.1 Stratégies ciblant directement la mitochondrie

#### 2.1.1 Inhibition du mPTP

L'ouverture du mPTP étant un évènement clé dans l'apparition des lésions de reperfusion, l'inhibition de son ouverture devrait être protectrice et représenter une cible intéressante pour le développement de stratégies cardioprotectrices. Effectivement, la démonstration de cette hypothèse a été faite grâce à l'utilisation de la cyclosporine A qui est capable de protéger le myocarde des lésions de reperfusion en inhibant l'ouverture du mPTP *via* sa fixation sur la cyclophiline D et l'inhibition de son activité peptidyl-isomérase (Griffiths et Halestrap, 1993). Son administration à la reperfusion retarde la mort cellulaire après anoxie *in vitro* (Nazareth *et al.*, 1991) et diminue la taille d'un infarctus dans des modèles d'ischémie-reperfusion *in vivo* (Argaud *et al.*, 2005 ; Skyschally *et al.*, 2010). Plusieurs études cliniques ont également permis de montrer un effet cardioprotecteur de la cyclosporine A chez l'homme (Piot *et al.*, 2008 ; Mewton *et al.*, 2010). Des analogues non immosuppresseurs de la cyclosporine A inhibent aussi l'ouverture du mPTP et présentent également des propriétés cardioprotectrices comme la méthylAla(3)éthylVal(4)-cyclosporine

ou Debio 025 (Gomez *et al.*, 2007) ou la N-méthyl-4-isoleucine cyclosporine ou NIM811 (Argaud *et al.*, 2005). Enfin, la sanglifehrine A qui possède un site de fixation à la cyclophiline D différent de celui de la cyclosporine A, inhibe également l'ouverture du mPTP et améliore la récupération de la fonction ventriculaire après ischémie-reperfusion (Clarke *et al.*, 2002). Par ailleurs, le ciblage pharmacologique de plusieurs autres composants putatifs du mPTP a également montré des effets cardioprotecteurs. Ainsi, l'induction de la fermeture de VDAC à l'aide d'un peptide de synthèse prévient l'apoptose cellulaire (Shimizu *et al.*, 2000) et réduit la taille de l'infarctus dans un modèle de cœur isolé perfusé chez le rat (Chen *et al.*, 2002). De la même façon plusieurs études ont montré que les ligands du TSPO protègent contre les lésions de reperfusion en limitant l'augmentation de perméabilité mitochondriale. Ainsi le SSR180575 et le 4'-chlorodiazepam, deux ligands de cette protéine, limitent les lésions liées à l'ischémie-reperfusion et améliorent les fonctions cardiaques dans un modèle d'ischémie-reperfusion régionale chez le rat (Leducq *et al.*, 2003 ; Obame *et al.*, 2007 ; Paradis *et al.*, 2013).

### 2.1.2 Modulation des flux calciques mitochondriaux

La forte augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitochondrial à la reperfusion est l'un des éléments favorisant l'ouverture du mPTP et donc les lésions de reperfusion. Plusieurs études ont montré que l'utilisation du rouge de ruthénium qui inhibe l'uniporteur calcique mitochondrial limite la surcharge calcique mitochondriale à la reperfusion et présente des propriétés cardioprotectrices (Ferrari *et al.*, 1982 ; Miyamae *et al.*, 1996).

De même le clonazepam, qui inhibe l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , réduit l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie lors de l'ischémie (sans l'inhiber à la reperfusion) et améliore la récupération cellulaire à la réoxygénation (Griffiths *et al.*, 1998).

L'utilisation d'agents découplants permet également de diminuer l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie à la reperfusion en diminuant le potentiel de membrane. Ainsi le 2,4-dinitrophénol administré à la reperfusion dans un modèle d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé perfusé permet de maintenir l'intégrité du sarcoleme (Elz et Nayler, 1988).

De la même façon l'activation du canal  $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$  par le diazoxide permet de protéger le myocarde des lésions liées à l'ischémie-reperfusion et l'une des hypothèses permettant d'expliquer cet effet serait la diminution du potentiel de membrane liée à l'entrée de  $\text{K}^+$  et qui limiterait la surcharge calcique (Garlid *et al.*, 1997).

### 2.1.3 Limitation de la production d'ERO

L'autre élément majeur dans l'induction de l'ouverture du mPTP est la production d'ERO qui est essentiellement mitochondriale lors de l'ischémie-reperfusion. Diverses stratégies permettant de capter, de réduire ou de dégrader les ERO produites ont montré des propriétés cardioprotectrices.

Ainsi l'utilisation d'un piègeur d'ERO, comme le alpha-phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) ou le N-(2-mercaptopropionyl)-glycine (MPG), permet de diminuer la taille de l'infarctus dans un modèle canin d'ischémie-reperfusion (Bolli *et al.*, 1988 ; Horwitz *et al.*, 1994). Une autre étude a également montré que l'édaravone, un autre piègeur d'ERO, inhibe également l'ouverture du mPTP et prévient les lésions de reperfusion dans un modèle d'ischémie-reperfusion régionale chez le rat (Rajesh *et al.*, 2003).

L'augmentation de la dégradation des ERO produites lors de l'ischémie-reperfusion permet également d'en limiter les effets délétères. Ainsi, l'utilisation d'une molécule mimant la SOD, le HO-3538, augmente la dégradation des ERO dans le micro-environnement du mPTP ce qui inhibe son ouverture et protège le myocarde de l'ischémie-reperfusion (Bognar *et al.*, 2006). Depuis, de nouvelles molécules anti-oxydantes capables de se concentrer au niveau de la mitochondrie et donc d'agir plus efficacement au niveau de la zone d'intérêt ont été développées et semblent plus prometteuses d'un point de vue clinique. Basée sur un antioxydant, l'ubiquinone, couplée à un cation amphiphile qui permet de traverser les membranes mitochondriales vers la matrice chargée négativement, la mito-ubiquinone ou mitoQ diminue les lésions induites par l'ischémie-reperfusion (Adlam *et al.*, 2005). D'autres peptides antioxydants ont également été synthétisés pour rentrer dans la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage ciblée vers la mitochondrie et ils réduisent la production mitochondriale d'ERO, inhibent l'ouverture du mPTP et diminuent les lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Zhao *et al.*, 2004 ; Szeto, 2008).

Le blocage transitoire de la chaîne respiratoire pendant l'ischémie ou à la reperfusion permet également de limiter la surproduction d'ERO à la reperfusion. Ainsi l'utilisation d'amobarbital, un inhibiteur du complexe I réduit fortement la production d'ERO à la reperfusion et diminue les lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Chen *et al.*, 2006).

L'inhibition du complexe I par des S-nitrosations réversibles permet également de ralentir la reprise d'activité de la chaîne respiratoire au moment de la reperfusion et de minimiser la production d'ERO par celle-ci. Ainsi, plusieurs études utilisant du nitrite ou des agents

contenant un noyau S-nitrosant ciblant la mitochondrie (mitoSNO) pour induire ces S-nitrosation ont montré que cette stratégie protège le myocarde des lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Chouchani *et al.*, 2013 ; Shiva et Gladwin, 2009).

Le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale peut également permettre de diminuer la production d'ERO si le découplage est modéré. Ainsi, la transfection de la protéine UCP1 dans une lignée cellulaire dérivée de cardiomyocytes permet de protéger les cellules contre l'hypoxie-réoxygénation (Bienengraeber *et al.*, 2003) et la sur-expression de cette protéine dans un modèle murin transgénique réduit les lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Hoerter *et al.*, 2004). A l'inverse, l'inactivation du gène codant pour la protéine UCP3 chez la souris augmente la taille de l'infarctus et cet effet est lié à une augmentation de la production d'ERO (Ozcan *et al.*, 2013).

Enfin, une autre hypothèse concernant le mécanisme de cardioprotection induit par l'activation des canaux mitoK<sub>ATP</sub> implique la réduction du stress oxydant à la réoxygénation (Ozcan *et al.*, 2002).

## 2.2 Stratégies ciblant indirectement la mitochondrie

### 2.2.1 Mitochondrie et conditionnement myocardique

L'une des méthodes les plus efficaces pour protéger le myocarde des lésions liées à l'ischémie-reperfusion est le pré-conditionnement ischémique (PCI). Décrit par Murry *et al.* (1986), il consiste en la réalisation de cycles successifs d'ischémie-reperfusion courts avant une ischémie prolongée et il permet de protéger le myocarde en retardant l'apparition de la nécrose myocardique (Benhabbouche *et al.*, 2011). Ce concept a été transposé à la reperfusion par Zhao *et al.* (2003) et est appelé post-conditionnement ischémique (PoCI) : de brefs épisodes ischémiques sont réalisés au moment de la reperfusion et avant une reperfusion définitive ce qui induit une protection équivalent au PCI. Une recherche abondante a montré que le PCI entraîne la libération d'agonistes de récepteurs couplés à des protéines G tels que les opioïdes, la bradykinine ou l'adénosine et que cela active une cascade de kinases cardioprotectrices appelée voie RISK (pour *Reperfusion Injury Salvation Kinase*) (Hausenloy et Yellon, 2007). Cette voie de signalisation est également impliquée dans l'effet protecteur induit par le PoCI (Murphy et Steenbergen, 2008) (voir figure 15).

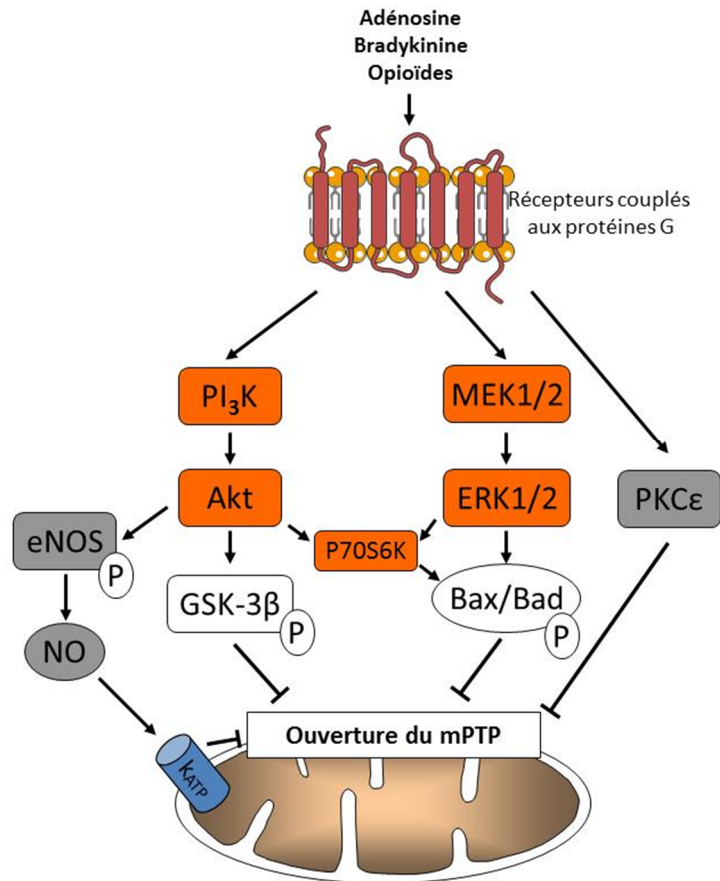


Figure 15 : Schéma des voies de survie mises en place lors des pré- et post-conditionnement myocardiques. Les ligands de récepteurs couplés aux protéines G initient l'effet cardioprotecteur en déclenchant une cascade de kinases aboutissant à l'inhibition de l'ouverture du mPTP et donc de la mort cellulaire. mPTP, pore de transition de perméabilité mitochondriale ;  $K_{ATP}$ , canal potassique mitochondrial ATP dépendant ; ERK1/2, extracellular regulated kinase ; MEK1/2, mitogen-activated protein kinase/ERK1/2kinase ; PI<sub>3</sub>K, Phosphoinositide 3-kinase ; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$  ; eNOS, endothelial nitric oxide synthase ; P70S6K, p70 ribosomal S6 protein kinase ; PKC $\epsilon$ , protéine kinase C $\epsilon$ .

Les mécanismes de cardioprotection mis en jeu lors du pré et du post-conditionnement restent incomplètement élucidés à ce jour mais de nombreux travaux indiquent que l'inhibition indirecte de la perméabilisation des membranes mitochondriales *via* l'inhibition de l'ouverture du mPTP pourrait être la cible finale de la voie RISK (Hausenloy *et al.*, 2009). Plusieurs hypothèses mécanistiques non exclusives ont été proposées pour expliquer cet effet (voir figure 15) :

- la génération de NO par la eNOS qui pourrait, seule ou par l'activation, de la voie PKG-PKC $\epsilon$ -mitoK $_{ATP}$  limiter l'ouverture du mPTP (Burwell et Brookes, 2008 ; Murphy et Steenbergen, 2008) ;

- l'inhibition par phosphorylation de GSK-3 $\beta$  qui inhibe l'ouverture du mPTP (Juhaszova *et al.*, 2004 ; Obame *et al.*, 2008) probablement par sa liaison à l'ANT (Nishihara *et al.*, 2007) ;
- la phosphorylation et/ou la formation de complexes avec la protéine PKC $\epsilon$  qui peut interagir avec le mPTP (Baines *et al.*, 2003) ;
- l'inhibition de signaux en aval de la voie RISK comme la translocation de Bax du cytoplasme vers la mitochondrie (Tsuruta *et al.*, 2002).

Une augmentation de la fuite basale de H<sup>+</sup> induite par les UCP à travers la membrane mitochondriale qui découplerait modérément la chaîne respiratoire et limiterait la surcharge calcique et la production d'ERO pourrait également participer à l'effet cardioprotecteur du PCI (Nadtochiy *et al.*, 2006).

### 2.2.2 Activation pharmacologique des voies de survie

La voie de signalisation RISK jouant un rôle majeur dans les mécanismes de cardioprotection, mimer les effets du PCI et du PoCI en ciblant pharmacologiquement cette voie de survie est un concept intéressant qui a été exploité.

De nombreuses molécules permettant l'activation de cette voie ont montré des propriétés cardioprotectrices. Ainsi l'administration d'adénosine ou de bradykinine active les récepteurs couplés aux protéines G et *in fine* la voie RISK et permet de protéger le myocarde des lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Bell et Yellon, 2003 ; Olafsson *et al.*, 1987).

Dans les myocytes ventriculaires, les opiacés endogènes se fixent sur deux types de récepteurs couplés aux protéines G ( $\delta$  et  $\kappa$ ) qui activent la voie RISK et l'administration de morphine, un agoniste non sélectif des récepteurs aux opiacés, juste avant la reperfusion diminue la taille de l'infarctus en augmentant la phosphorylation de GSK-3 $\beta$  (Gross *et al.*, 2004). Des travaux plus récents ont montré que cet effet cardioprotecteur implique les canaux mitoK<sub>ATP</sub> (Gross *et al.*, 2007) et l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Obame *et al.*, 2008).

De même, l'administration d'un cocktail glucose-insuline-potassium au début de la reperfusion diminue la taille de l'infarctus en activant la voie RISK (Jonassen *et al.*, 2000, 2001). Cet effet est également associé à une inhibition de l'ouverture du mPTP (Davidson *et al.*, 2006).

Il est par ailleurs possible d'agir en aval dans la voie RISK et d'activer ou d'inhiber directement certaines protéines qui la composent. Ainsi, les statines présentent,



indépendamment de leur effet sur les lipides, une activité cardioprotectrice *via* l'activation de plusieurs kinases de la voie RISK, du canal mitoK<sub>ATP</sub> et d'une inhibition de l'ouverture du mPTP (Efthymiou *et al.*, 2005). De même, le SB-216763, inhibiteur de GSK-3 $\beta$ , réduit la taille de l'infarctus chez le rat et cet effet est associé à l'activation du canal mitoK<sub>ATP</sub> et à l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Gross *et al.*, 2008 ; Obame *et al.*, 2008).

En résumé, l'étude des mécanismes mis en jeu lors du PCI et du PoCI a permis ces dernières années de développer de nombreuses stratégies cardioprotectrices. Bien que la compréhension de ces mécanismes ne soit pas complète il est clair que la mitochondrie et plus particulièrement le mPTP joue un rôle central dans l'effet cardioprotecteur de ces stratégies.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à une nouvelle stratégie cardioprotectrice aussi efficace que le PCI qui va être détaillée dans le chapitre 3 : la sur-expression de la protéine Hsp22.

# Chapitre 3 : La protéine Hsp22

## 1 Structure et fonction

La protéine Hsp22 aussi appelée H11 kinase, HspB8 ou  $\alpha$ C-cristalline est une protéine de 22 kDa appartenant à la famille des *small Heat Shock Protein* (sHsp) dont dix membres ont été identifiés chez l'homme (Kappe *et al.*, 2003). Les membres de cette famille partagent un domaine appelé  $\alpha$ -cristalline constitué de 80-100 résidus d'acides aminés et localisé dans la partie C-terminale de ces protéines qui s'assemblent généralement en larges complexes oligomériques (Narberhaus, 2002). Leur expression est stimulée par la chaleur et elles présentent une activité chaperonne en inhibant notamment l'agrégation de protéines cibles dans des modèles *in vitro*.

Hsp22 partage certaines de ces caractéristiques mais se distingue des autres sHsp par une structure prédominante aléatoirement enroulée, l'absence de la structure en feuillet  $\beta$  typique des sHsp et sa présence sous forme de monomère *in vitro* (Chowdary *et al.*, 2004). Une étude *in vitro* plus récente indique que la Hsp22 chez le rat peut former des oligomères divers qui sont en équilibre dynamique (Yang *et al.*, 2012). Hsp22 contient également un domaine dont l'activité sérine/thréonine kinase dépend du  $Mn^{2+}$  (Smith *et al.*, 2000). Elle est capable d'interagir avec Hsp27 (Benndorf *et al.*, 2001) et d'autres sHsp (Sun *et al.*, 2004) qui induisent la survie des cardiomyocytes. *In vitro*, elle peut être phosphorylée par PKC sur deux sites (Ser14 et Thr63) et par la *p44-mitogen activated protein kinase* (ou P44-MAPK) sur deux autres sites (Ser27 et Thr87) (Benndorf *et al.*, 2001).

Hsp22 a été découverte chez l'homme dans une étude qui s'intéressait aux gènes homologues de la grande sous-unité (R1) de la protéine ICP10 (une ribonucléotide réductase) de l'herpès simplex virus, protéine impliquée dans la survie des cellules infectées par ce virus, car elle présente des homologies avec un domaine protéine kinase de ICP10 (Smith *et al.*, 2000). Hsp22 est exprimée dans de nombreux tissus mais est plus abondante dans le cœur, le muscle squelettique et le placenta. Une forme mutée avec une seule substitution nucléotidique (W51C) de cette protéine a également été impliquée dans le développement de tumeurs (mélanome et cancer du sein) (Yu *et al.*, 2001). D'autres mutants ont été impliqués dans des maladies neurologiques (Dierick *et al.*, 2005) et neuromusculaires

(Kim *et al.*, 2006) mais aussi dans le développement de l'arthrite rhumatoïde (Roelofs *et al.*, 2006).

## **2 Hsp22 dans le myocarde**

### **2.1 Hsp22 et stress myocardique**

La présence d'Hsp22 dans le myocarde humain a été découverte lors d'une étude qui recherchait les protéines interagissant avec Hsp27 dans cet organe (Benndorf *et al.*, 2001). Sa régulation dans les pathologies cardiovasculaires a été détectée pour la première fois par la méthode de profilage génétique utilisée dans un modèle porcin de sidération myocardique qui est une dysfonction contractile prolongée du cœur ischémié qui persiste après reperfusion mais qui aboutit à terme à une récupération complète des fonctions cardiaques. Dans le myocarde sidéré, il y a une rapide augmentation de l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire (en bloquant l'apoptose ou en activant la survie cellulaire) et une sur-expression d'Hsp22 a été détectée dans la partie sous-endocardique dès le début de la reperfusion ainsi que dans la partie sous-épicardique plus tardivement. Elle atteint un maximum à 1h de reperfusion et disparaît après 12 heures de reperfusion (Depre *et al.*, 2001).

Cette sur-expression a ensuite été mise en évidence dans un autre type de maladie ischémique, l'hibernation myocardique qui est une dysfonction myocardique chronique consécutive à la répétition d'épisodes ischémiques et qui disparaît au décours de la revascularisation. Dans un modèle porcin d'hibernation myocardique, induite par six épisodes de 90 min d'ischémie chacun étant suivi d'une heure de reperfusion, un programme génétique de survie cellulaire identique à celui observé dans le modèle de sidération est chroniquement activé et Hsp22 est de nouveau retrouvée parmi les gènes régulés. Cette approche expérimentale a été confirmée chez des patients présentant une hibernation myocardique chez qui des biopsies de la zone atteinte et de la zone saine ont été réalisées. La comparaison du transcriptome de ces deux zones a permis de valider les résultats trouvés dans le modèle porcin et de confirmer la sur-expression d'Hsp22 dans la zone atteinte (Depre *et al.*, 2004).

Hsp22 est donc sur-exprimée à la fois dans un modèle d'ischémie aiguë et dans un modèle d'ischémie chronique. Ce programme de survie cellulaire qui est activé par l'ischémie dans un modèle porcin et qui inclut la protéine Hsp22 est également retrouvé chez l'homme. Il est

intéressant de noter que cette sur-expression d'Hsp22 n'est pas spécifique du cœur puisqu'elle a aussi été observée après une ischémie-reperfusion rénale (Kelly *et al.*, 2001).

Outre les pathologies ischémiques du myocarde, une sur-expression de la protéine Hsp22 a également été mise en évidence dans des modèles d'hypertrophie myocardique, notamment dans un modèle canin d'hypertrophie sévère chronique (2 ans) du myocarde induite par constriction de l'aorte transverse (Depre *et al.*, 2002). Cette augmentation est retrouvée au niveau de l'ARNm et de la protéine et correspond respectivement à 4 et 3 fois la valeur trouvée chez les animaux sains.

L'utilisation de ces modèles, très descriptifs, associée au rôle joué par l'homologue viral d'Hsp22 (*i.e.* ICP10) dans l'immortalisation des cellules infectées par le virus de l'herpès ont permis de supposer que la sur-expression d'Hsp22 dans les maladies ischémiques et dans l'hypertrophie jouait un rôle important dans la survie et la croissance cellulaire, ce qui a ensuite été confirmé.

## 2.2 Effets de la Hsp22 dans le myocarde

### 2.2.1 Hsp22 induit la croissance des cardiomyocytes

Afin de caractériser le rôle physiologique de Hsp22, notamment dans le myocarde, des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* ont été mis au point. Ainsi, un modèle *in vitro* de sur-expression d'Hsp22 induit par infection de cardiomyocytes néonataux de rat avec un adénovirus contenant la séquence d'Hsp22 a été développé. Ce modèle a permis de montrer qu'à faibles niveaux de sur-expression, Hsp22 induit une augmentation du rapport protéine/ADN ce qui démontre qu'Hsp22 est capable d'induire une hypertrophie cardiomyocytaire (Hase *et al.*, 2005). Un modèle murin transgénique sur-exprimant spécifiquement Hsp22 dans le myocarde a ensuite été généré pour étudier la fonction d'Hsp22 *in vivo*. Ce modèle est caractérisé par une augmentation du diamètre transversal des cardiomyocytes et par une hypertrophie myocardique dont l'amplitude est proportionnelle au niveau de sur-expression de la protéine Hsp22, ce qui confirme les observations *in vitro*, à savoir que la sur-expression d'Hsp22 est suffisante pour promouvoir l'hypertrophie cardiaque (Depre *et al.*, 2002). De plus, l'augmentation de la taille du myocarde dans ce modèle n'affecte pas la fonction contractile, rappelant l'adaptation hypertrophique rencontrée dans le cœur des athlètes.

### 2.2.2 Effets sur la survie des cardiomyocytes

Ces deux modèles ont également permis de montrer que la protéine Hsp22 possède différents effets sur la survie des cardiomyocytes. En effet, dans le modèle *in vitro* précédemment cité, une forte sur-expression d'Hsp22 induit la mort cellulaire par apoptose des cardiomyocytes (Hase *et al.*, 2005). Les auteurs ont également montré que cette activité proapoptotique est dépendante de l'activité kinase d'Hsp22 puisque l'utilisation d'une protéine Hsp22 dénuée d'activité kinase n'induit plus l'apoptose. Enfin, ils ont mis en évidence par co-immunoprécipitation une interaction entre Hsp22 et la caséine kinase 2 (CK2), protéine qui a des effets antiapoptotiques dans les cardiomyocytes (Li *et al.*, 2002), et ont émis l'hypothèse qu'Hsp22 aurait un effet proapoptotique en inhibant la CK2. De façon intéressante, dans certains mélanomes pour lesquels l'expression de la Hsp22 est diminuée *via* des méthylations aberrantes de l'ADN, la restauration de l'expression d'Hsp22 a des effets proapoptotiques (Smith *et al.*, 2012).

L'augmentation de sur-expression d'Hsp22 dans le modèle murin transgénique correspond à l'augmentation retrouvée dans le modèle porcin d'ischémie-reperfusion et chez les patients mais elle n'est pas suffisante pour produire l'effet proapoptotique observé *in vitro*. En revanche, après ischémie-reperfusion, la sur-expression de la protéine Hsp22 diminue fortement la taille de l'infarctus limitant la nécrose et l'apoptose cellulaire (Depre *et al.*, 2006a) et dans un modèle de toxicité cellulaire induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, elle limite également l'apoptose de cardiomyocytes néonataux de rat (Chen *et al.*, 2011).

La protéine Hsp22 possède donc des propriétés proapoptotiques à fortes concentrations alors qu'elle limite l'apoptose et protège le myocarde à plus faibles concentrations.

### 2.3 Voies de signalisation activées par Hsp22

Les études menées *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier plusieurs voies de signalisation différentes régulées par la protéine Hsp22. Ainsi, Hsp22 induit l'activation de la voie Akt et de la voie 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) qui sont deux voies de survie mais qui présentent des effets antagonistes en ce qui concerne la croissance cellulaire (Danan *et al.*, 2007). Plus récemment, la voie JAK/STAT a également été identifiée comme cible de Hsp22 (Qiu *et al.*, 2011), tout comme le protéasome (Hedhli *et al.*, 2008).

#### 2.3.1 Voie Akt

La voie Akt joue un rôle primordial dans le programme de survie cellulaire mis en place par Hsp22. Akt est une sérine/thréonine kinase dont l'activation est associée à la

diminution de la mort cellulaire, la stimulation de la croissance cellulaire et l'activation du métabolisme du glucose (Burgering et Coffey, 1995). Les effets antiapoptotiques d'Akt sont liés à l'inhibition par phosphorylation de cibles cytoplasmiques (Bad, caspase 9, GSK-3 $\beta$ ) et à l'activation de la eNOS mais ils impliquent également la régulation de cibles nucléaires requérant la translocation d'Akt dans le noyau (Shiraishi *et al.*, 2004). En plus de ses effets antiapoptotiques, Akt favorise l'utilisation du glucose *via* la stimulation de son transport, de son oxydation dans la glycolyse et de la synthèse de glycogène (Depre *et al.*, 1998). Enfin Akt active la croissance cellulaire par son action sur la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*). La voie mTOR est principalement régulée par TSC1/TSC2, un complexe de deux suppresseurs de tumeur, qui sont des inhibiteurs de mTOR. Akt phosphoryle et inhibe TSC2 ce qui induit l'activation de mTOR qui stimule la synthèse protéique et la croissance cellulaire (Inoki *et al.*, 2002).

Hsp22 joue le rôle de chaperonne pour Akt en se liant directement à celle-ci ce qui augmente sa phosphorylation, favorise son association en un complexe multiprotéique avec AMPK ainsi que sa redistribution dans les différents compartiments cellulaires (Depre *et al.*, 2006a). Bien qu'Hsp22 possède une activité kinase, l'augmentation de phosphorylation d'Akt par Hsp22 n'est pas liée à une phosphorylation directe mais plutôt à l'activation de la voie PI<sub>3</sub>K. Des expériences d'immunoprécipitation utilisant des protéines purifiées ont permis de confirmer qu'Hsp22 et Akt interagissent directement et que cette interaction est prédominante dans la région périnucléaire mais est présente également dans le cytosol (Depre *et al.*, 2006a). Hsp22 ne pénètre pas dans le noyau mais s'accumule à sa périphérie, elle n'est donc pas impliquée dans l'entrée d'Akt dans le noyau mais plutôt dans son accumulation périnucléaire ce qui peut favoriser indirectement son entrée. Le rôle d'Akt au niveau périnucléaire reste peu étudié mais il pourrait participer à la survie cellulaire en affectant le réticulum endoplasmique qui entoure le noyau et plus particulièrement le mécanisme appelé *unfolded protein response* (UPR) (Xu *et al.*, 2005). Outre sa translocation vers la région périnucléaire, Hsp22 active également Akt au niveau du cytosol *via* son activité chaperonne ce qui participe à l'effet antiapoptotique d'Akt (Depre *et al.*, 2006a).

### 2.3.2 Voie AMPK

La deuxième voie de survie activée par Hsp22 implique AMPK, un complexe hétérotrimérique comportant 3 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), dont la sous-unité  $\alpha$  existe sous deux formes,  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 (Hardie *et al.*, 1998). AMPK est une kinase qui favorise le métabolisme du

glucose dans le myocarde en réponse à une déplétion en oxygène et donc améliore la survie cellulaire dans des conditions anoxiques. Elle est également impliquée dans le blocage de la croissance cellulaire.

La diminution de l'oxygène dans le myocarde lors d'une ischémie entraîne une modification des processus métaboliques myocardiques qui se traduit par une augmentation de la dépendance au glucose et à la glycolyse (Depre *et al.*, 1999). AMPK est responsable de l'activation de différentes étapes spécifiques de cette réponse métabolique à l'ischémie. L'activation d'AMPK a des effets à court terme (par des phosphorylations) mais également à long terme (notamment par l'activation de l'*hypoxia-inducible factor 1-alpha* ou HIF-1 $\alpha$ ). Ainsi à court terme, AMPK améliore l'entrée du glucose dans le myocarde en favorisant la translocation du transporteur de glucose à la membrane. AMPK favorise également la glycolyse en phosphorylant et activant la 6-phosphofructo-2-kinase, ce qui entraîne une augmentation de la fructose-2,6-bisphosphate, un activateur essentiel de la glycolyse (Hardie, 2004). Ces effets métaboliques sont très efficaces pour protéger le myocarde ischémié de dommages irréversibles. Les effets à plus long terme impliquent la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  qui va induire l'expression de facteurs de croissance, d'enzymes du métabolisme ainsi que de protéines cytoprotectrices (Semenza, 2003).

AMPK possède également des effets anti-croissance *via* son action sur mTOR. Comme Akt, AMPK phosphoryle TSC2 mais contrairement à Akt cette phosphorylation active TSC2 ce qui inhibe mTOR, la biosynthèse et la croissance cellulaire (Inoki *et al.*, 2003).

L'activation de l'AMPK qui est induite par l'augmentation de la concentration en AMP (et donc lorsque l'ATP diminue) permet 1) de stopper les processus consommateurs d'ATP (comme la biosynthèse) *via* son action sur mTOR et 2) d'orienter le métabolisme vers des processus cataboliques produisant de l'ATP comme l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras.

Les études expérimentales menées sur la souris sur-exprimant la protéine Hsp22 dans le myocarde ont mis en évidence que la phosphorylation d'AMPK était augmentée. Cette activation a été retrouvée dans le modèle *in vitro* de sur-expression d'Hsp22 (Depre *et al.*, 2006a). Tout comme avec Akt, Hsp22 se lie à AMPK et favorise sa translocation vers l'espace périnucléaire. Cette activation d'AMPK s'accompagne de l'augmentation du glycogène dans le myocarde ainsi que de l'augmentation de l'expression de la protéine de transport de glucose GLUT1. Il a également été montré par co-immunoprécipitation qu'Hsp22 interagit

avec la phosphoglucomutase, une enzyme impliquée dans la glycogénogenèse qui catalyse la conversion du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate (Wang *et al.*, 2004). Hsp22, *via* son action sur AMPK, augmente donc la synthèse du glycogène, un substrat essentiel au cœur stressé en condition d'ischémie. Hsp22 active également les effets à long terme de la voie AMPK puisque le taux d'HIF-1 $\alpha$  est augmenté chez les souris sur-exprimant Hsp22, tout comme l'expression des gènes cibles de HIF-1 $\alpha$  tels que le *vascular endothelial growth factor*, l'hème oxygénase-1 et d'autres enzymes participant au transport et au métabolisme du glucose (Depre *et al.*, 2006a). Il est intéressant de noter qu'un profil génomique similaire est retrouvé dans le myocarde de patients présentant une hibernation myocardique (Depre *et al.*, 2004).

Hsp22 active Akt et AMPK qui ont des effets antagonistes sur la croissance cellulaire *via* leur action opposée sur la voie mTOR. Or, dans le modèle de souris sur-exprimant Hsp22, la voie mTOR est activée ce qui indique qu'AMPK n'interfère pas avec la croissance cellulaire ou du moins que son effet est masqué par celui d'Akt. La redistribution subcellulaire d'Akt et d'AMPK en faveur de l'espace périnucléaire induite par Hsp22 pourrait prévenir les effets sur la croissance cellulaire de la forme cytosolique d'AMPK, ce qui permettrait à AMPK et Akt d'exercer leurs effets cytoprotecteurs sans qu'AMPK n'interfère sur la croissance cellulaire induite par Akt.

### 2.3.3 Activation de STAT3

Plus récemment, il a été montré qu'Hsp22 est un activateur de la protéine *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) (Qiu *et al.*, 2011). STAT3 appartient à la voie janus kinase/STAT ou JAK/STAT. La voie JAK/STAT joue un rôle limité en conditions physiologiques mais devient prédominante en conditions de stress (Boengler *et al.*, 2008). Elle est activée par les protéines de la famille des interleukin-6 (IL-6) qui se lient à des récepteurs membranaires activant JAK. JAK active à son tour les facteurs de transcription STAT qui sont transloqués dans le noyau où ils se lient à des régions promotrices de gènes cibles tels que les gènes codants pour la iNOS ou la Mn-SOD. Au niveau du myocarde, la voie JAK/STAT a été impliquée dans les conditionnements ischémiques qui induisent une activation de STAT3. Alors que la fenêtre tardive du PCI met en jeu la régulation de l'expression de gènes, et notamment la fonction facteur de transcription de STAT3, la fenêtre précoce du PCI est indépendante de la transcription de gènes et dans cette phase STAT3 exerce un effet protecteur par un autre mécanisme qui implique des modifications



directes au niveau de la mitochondrie. Cette idée est confortée par la démonstration que STAT3 est présent sous forme phosphorylé au niveau mitochondrial (surtout au niveau matriciel) et que l'inhibition de sa phosphorylation ou son absence dans des mitochondries issues de souris invalidées pour le gène STAT3 diminue la phosphorylation oxydative (Wegrzyn *et al.*, 2009). De plus une interaction entre STAT3 et la cyclophiline D a été découverte, ce qui pourrait expliquer la moindre résistance à l'ouverture du mPTP induite par le  $Ca^{2+}$  constatée dans des mitochondries isolées à partir de cœurs de souris invalidées pour le gène STAT3 (Boengler *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la voie JAK/STAT a également été impliquée dans le développement d'hypertrophie concentrique adaptative dans des modèles d'hypoxie intermittente de cœur de rat (Chen *et al.*, 2007) qui est comparable à celle constatée chez les souris sur-exprimant Hsp22.

Une étude réalisée sur des souris invalidée pour le gène Hsp22 dont l'objectif initial était de caractériser la réponse de ces souris à un stress myocardique par surcharge barométrique a permis de montrer que l'absence de cette protéine diminue non seulement l'activité facteur de transcription de STAT3 mais également la quantité de STAT3 dans la mitochondrie ainsi que la phosphorylation oxydative (Qiu *et al.*, 2011). Hsp22 et STAT3 co-immunoprécipitent dans la mitochondrie, la sur-expression d'Hsp22 augmente la phosphorylation de STAT3 et cette activation de STAT3 est due à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui augmente la production de l'IL-6 et donc la stimulation de la voie JAK/STAT. A l'inverse des expériences *in vitro* d'inactivation d'Hsp22 ont permis de vérifier qu'en absence d'Hsp22 la phosphorylation de STAT3 diminue et que l'activation de NF- $\kappa$ B ou de la voie JAK/STAT sont inefficaces pour induire cette phosphorylation. Ces résultats démontrent que l'interaction entre Hsp22 et STAT3 est nécessaire pour que l'association entre STAT3 et son récepteur et/ou sa phosphorylation se fasse correctement et également qu'Hsp22 induit l'activation de STAT3, tant au niveau nucléaire que mitochondrial (figure 16).

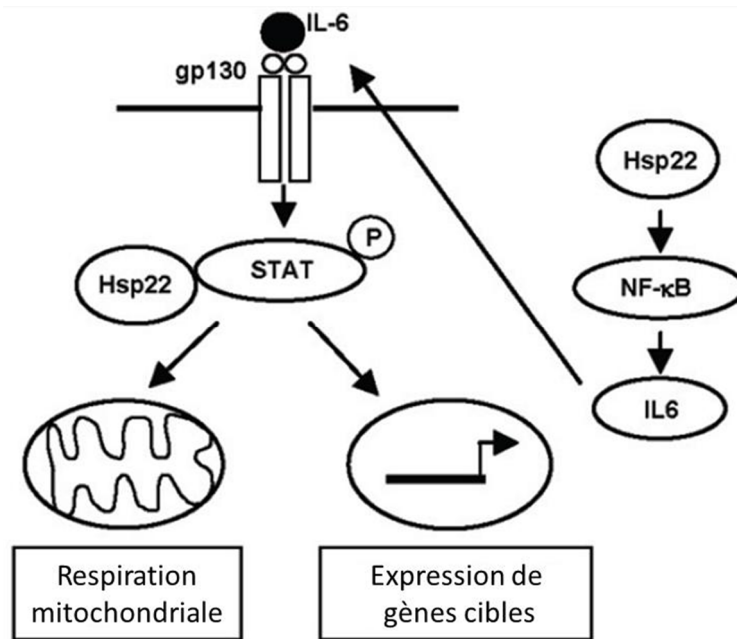


Figure 16 : Activation de la voie JAK/STAT par Hsp22 (Qiu *et al.*, 2011).

#### 2.3.4 Activation du protéasome

Le rôle de l'activation du protéasome dans l'hypertrophie induite par Hsp22 a également été mis en évidence (Hedhli *et al.*, 2008). Le protéasome est composé d'une sous-unité catalytique 20S coiffée de deux sous-unités régulatrices 19S ou 11S (Powell, 2006). Il représente la voie principale de dégradation des protéines intracellulaires qui sont dans un premier temps « marquées » par ubiquitination puis dégradées par le protéasome. Il joue un rôle majeur dans le contrôle de la qualité des protéines, permettant la dégradation des protéines endommagées, mal assemblées ou anormales. Le rôle du protéasome dans l'hypertrophie myocardique reste largement inexploré, mais l'augmentation de la taille des cardiomyocytes résulte d'une adaptation du taux de synthèse et de dégradation des protéines (Hedhli *et al.*, 2005). Dans un modèle canin d'hypertrophie myocardique induite par surcharge barométrique, l'activité du protéasome est non seulement augmentée mais son inhibition réduit l'hypertrophie (Depre *et al.*, 2006b). De plus l'activation du protéasome pendant un stress est nécessaire pour maintenir une réserve d'acides aminés suffisante pour la synthèse de nouvelles protéines (Vabulas et Hartl, 2005) et sa translocation vers la périphérie nucléaire induite par un stress cellulaire chez la levure favorise la survie cellulaire en maintenant l'intégrité de l'ADN (Takeda et Yanagida, 2005).

Dans le modèle de souris sur-exprimant Hsp22, l'expression protéique des différents acteurs du protéasome ainsi que l'activité de ce dernier sont augmentées (Hedhli *et al.*, 2008). Cette augmentation n'est pas retrouvée au niveau des ARNm ce qui suggère l'existence d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle du protéasome par Hsp22. Les auteurs ont également montré par immunoprécipitation qu'Hsp22 interagit avec les différentes sous-unités du protéasome ce qui pourrait participer à sa stabilisation. De plus, Hsp22 induit une translocation du protéasome au niveau de l'espace périnucléaire qui n'est pas retrouvée chez les animaux sauvages. Enfin l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, l'epoxomicine, abolit la différence d'activité du protéasome entre les deux types de souris et réduit l'hypertrophie myocardique chez les souris transgéniques. Des résultats similaires ont été retrouvés *in vitro* dans un modèle de sur-expression d'Hsp22 ce qui confirme que l'inhibition du protéasome empêche la croissance cellulaire induite par Hsp22 (Hedhli *et al.*, 2008).

L'effet hypertrophique d'Hsp22 est donc en partie lié à l'activation du protéasome qui interférerait, par un mécanisme encore inconnu, avec la synthèse protéique. Hedhli *et al.* (2008) avancent l'hypothèse que lors d'un stress barométrique, l'augmentation par le protéasome de la dégradation de protéines régulant négativement la croissance cellulaire favoriserait cette croissance.

Hsp22 induit la translocation et l'activation de différents messagers cellulaires qui favorisent leurs interactions. Elle est responsable de l'activation d'un programme génomique de survie qui implique une réponse antiapoptotique, une adaptation métabolique et la croissance cellulaire.

### **3 Hsp22 et cardioprotection**

Dès 2006, Depré *et al.* ont démontré que la sur-expression d'Hsp22 chez la souris la protège contre l'ischémie-reperfusion et que cette protection est équivalente à celle conférée par le PCI, actuellement la référence en matière de cardioprotection. Le PCI comprend deux fenêtres d'action pendant lesquelles il est efficace. La première, qui dure entre 1 et 2 heures après le stimulus ischémique, est dépendante de l'activation de voies de survie (Hausenloy et Yellon, 2006). La seconde confère une cardioprotection entre 24 et 72 h après le stimulus et résulte de la modification d'expression de plusieurs gènes (Hausenloy et Yellon, 2010). L'un des médiateurs principaux de cette deuxième fenêtre est la iNOS mais

d'autres protéines cytoprotectrices sont également sur-exprimées (la cyclooxygénase 2, des Hsp, la SOD...).

De façon intéressante, Hsp22 est capable d'agir sur les mêmes acteurs que ceux impliqués dans le PCI, tant au niveau de la fenêtre précoce que de la fenêtre tardive.

Ainsi la sur-expression d'Hsp22 dans le modèle murin augmente la phosphorylation et donc l'activation d'Akt (Depre *et al.*, 2002). Cette activation est dépendante de la voie PI<sub>3</sub>K puisque le traitement par la wortmannin rend quasiment indétectable la phosphorylation d'Akt chez ces souris. L'activation d'Akt chez ces souris est confirmée par l'augmentation des formes phosphorylées de différents effecteurs activés par Akt. Ainsi, la phosphorylation de GSK-3 $\beta$ , de Bad, de la eNOS et du facteur de transcription Foxo à des sites spécifiques d'Akt est augmentée. Dans le cytoplasme, Akt inhibe GSK-3 $\beta$ , qui induit la mort cellulaire, ainsi que Bad qui est proapoptotique. A l'inverse il active la eNOS qui est cytoprotective. Dans le noyau, l'inhibition de Foxo par Akt augmente l'expression des Hsp (Kim *et al.*, 2005) et effectivement, une sur-expression de Hsp27 et de Hsp70 a été retrouvée chez les souris sur-exprimant Hsp22 (Depre *et al.*, 2006a). Une autre étude a permis de montrer que l'activation de la voie PI<sub>3</sub>K/Akt dans ce modèle est liée à la potentialisation du récepteur à la *bone morphogenetic protein* ou BMP (Sui *et al.*, 2009). Hsp22 stimule donc l'activation d'Akt qui participe à la fois à la fenêtre précoce du PCI par ses effets cytoplasmiques mais également à la fenêtre tardive par ses effets nucléaires.

Hsp22 active également d'autres effecteurs situés plus en aval de la signalisation PI<sub>3</sub>K/Akt. En effet, une activation de PKC $\epsilon$  est également retrouvée chez les souris sur-exprimant Hsp22 et elle est inhibée par la wortmannin, ce qui montre qu'elle dépend de mécanismes nécessitant la participation de PI<sub>3</sub>K. PKC $\epsilon$  active AMPK (Nishino *et al.*, 2004), qui a son tour active HIF-1 $\alpha$  (Lee *et al.*, 2003). Ces résultats ont été confirmés dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de sur-expression d'Hsp22 où une activation de AMPK et de HIF-1 $\alpha$  a été détectée (Depre *et al.*, 2006a).

Plus récemment une activation de STAT3 et de la voie JAK/STAT par la protéine Hsp22 a été décrite (Qiu *et al.*, 2011). Les études sur les modèles de sur-expression *in vivo* et *in vitro* d'Hsp22 ont montré qu'Hsp22 active les fonctions nucléaire et mitochondriale de STAT3 ce qui pourrait participer à l'effet cardioprotecteur de Hsp22. Cependant, des études complémentaires sont encore à mener pour vérifier l'importance de STAT3 dans l'effet cardioprotecteur d'Hsp22 d'autant plus que le rôle de STAT3 dans la cardioprotection a été

bien documenté (Boengler *et al.*, 2008). En effet, la sur-expression de STAT3 dans un modèle de souris transgéniques réduit la taille de l'infarctus après ischémie-reperfusion (Oshima *et al.*, 2005). A l'inverse, un modèle de souris invalidée pour la protéine STAT3 dans le myocarde présente une sensibilisation à l'ischémie-reperfusion lorsque la durée de l'ischémie est longue, pouvant se traduire par une augmentation de la taille de l'infarctus (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004). L'inhibition de la voie JAK/STAT abolit l'activation de STAT3 après PCI ainsi que l'effet protecteur du PCI (Hattori *et al.*, 2001) ce qui montre que STAT3 est essentiel à la cardioprotection par le PCI et notamment lors de la phase tardive où STAT3 exerce son effet protecteur en modifiant l'expression de certains gènes tels que la iNOS et la MnSOD.

STAT3 et AMPK (*via* son action sur HIF-1 $\alpha$ ) sont capables de déclencher une augmentation de l'expression de la iNOS qui est le médiateur principal de la fenêtre tardive du PCI. Cette augmentation est retrouvée dans le modèle murin de sur-expression d'Hsp22 (Depre *et al.*, 2006a). L'importance de la iNOS dans l'effet cardioprotecteur d'Hsp22 a été vérifiée sur un modèle porcin de sur-expression d'Hsp22 *via* son infection par un adénovirus. Dans ce modèle la sur-expression d'Hsp22 induit une sur-expression de iNOS et après ischémie-reperfusion, l'effet cardioprotecteur conféré par Hsp22 disparaît si les animaux sont traités au préalable par un inhibiteur des NOS, le L-N<sup>ω</sup>-Nitroarginine (L-NNA) (Chen *et al.*, 2011).

Pour conclure, Hsp22 confère donc une cardioprotection similaire à celle obtenue avec le PCI et cette similitude concerne non seulement l'efficacité de l'approche mais également les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ces deux stratégies. Elle active les médiateurs impliqués dans la fenêtre précoce (voie RISK, PKC $\epsilon$ , voie JAK/STAT) et la fenêtre tardive du PCI (voie JAK/STAT, iNOS, Hsp...) (figure 17).

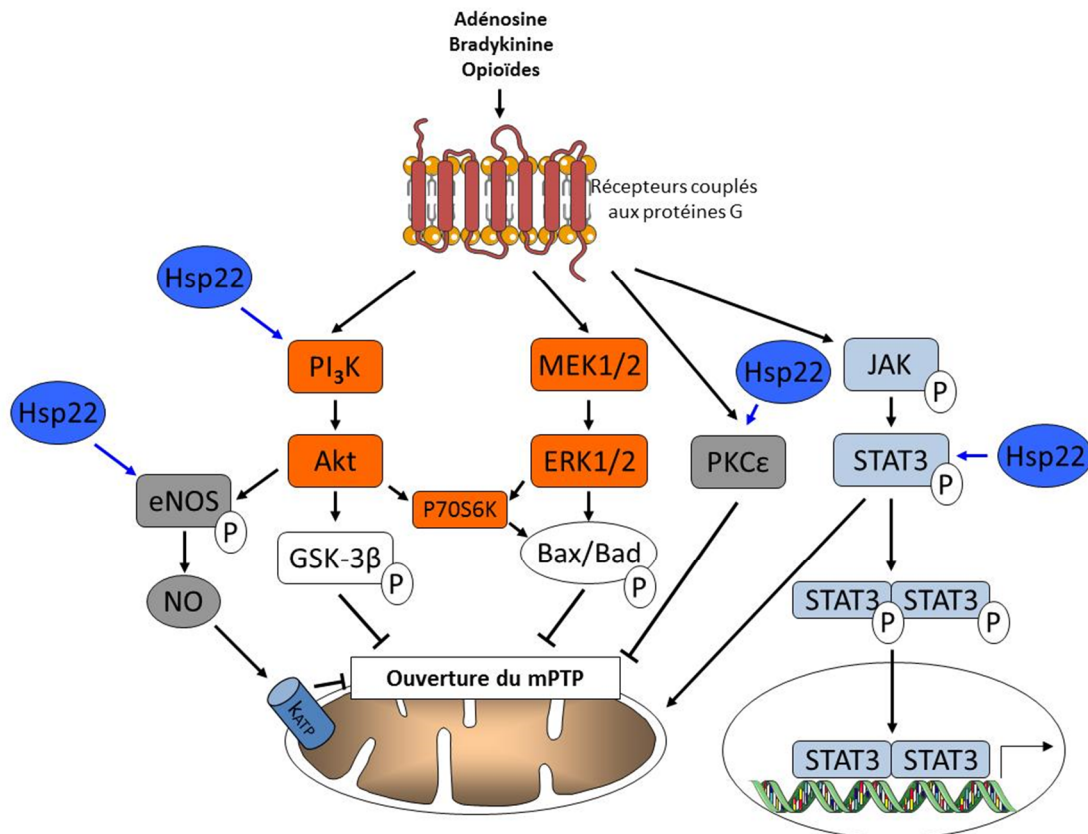


Figure 17 : Activation des voies de survie par Hsp22. Hsp22 active les mêmes acteurs moléculaires que le pré-conditionnement ischémique (PCI) et notamment ceux appartenant à la voie RISK ou à la voie JAK/STAT.

#### 4 Autres effets de la protéine Hsp22

La protéine Hsp22 a été étudiée dans d'autres contextes physiopathologiques que la pathologie cardiaque et nous nous limiterons ici à résumer son rôle potentiel au cours du vieillissement et dans le cancer. Des mutations d'Hsp22 ont aussi été mises en évidence dans de nombreuses neuropathies ou troubles neuromusculaires mais ce sujet ne sera pas abordé ici.

##### 4.1 Hsp22 et vieillissement

Le vieillissement est un processus complexe qui s'accompagne d'une diminution de la tolérance et de la réponse cellulaire à différentes formes de stress. Différentes théories expliquant le vieillissement ont été développées (Vina *et al.*, 2007). Bien que toujours débattue, la théorie la plus acceptée et la plus étudiée est la théorie des radicaux libres (Harman, 1956). Elle avance l'idée que le vieillissement est causé par une accumulation de dommages macromoléculaires induits par les ERO et comme la mitochondrie est la source

principale d'ERO dans la cellule elle est au centre de cette théorie. Des analyses génomiques dans différents modèles de vieillissement et différents organismes ont identifié des profils transcriptionnels communs. Ainsi le vieillissement diminue l'expression de nombreuses protéines mitochondriales notamment des composants de la chaîne respiratoire mitochondriale, de l'ATP synthase ainsi que du cycle de Krebs (McCarroll *et al.*, 2004). Plusieurs mutants de *Caenorhabditis elegans* et de *Drosophila melanogaster* qui ont une durée de vie accrue ont été décrits. Ils présentent aussi une résistance au stress et une tolérance à la température et c'est pourquoi le rôle des sHsp dans le vieillissement a été étudié (Kurapati *et al.*, 2000).

Parmi les 4 sHsp présentes chez la drosophile, Hsp22 est la seule qui est très peu induite par la chaleur et qui est très fortement augmentée avec le vieillissement. Au cours du vieillissement, la quantité d'ARNm d'Hsp22 est multipliée par 50 et l'expression protéique par 160 (King et Tower, 1999). De façon intéressante, des mouches sélectionnées pour leur durée de vie supérieure présentent une augmentation de l'expression plus précoce d'Hsp22 (Kurapati *et al.*, 2000). Ceci suggère un rôle protecteur d'Hsp22 dans le vieillissement d'autant plus qu'il a été montré qu'Hsp22 est localisée dans la matrice mitochondriale sous forme d'oligomères chez la drosophile, donc au niveau d'un acteur central dans le vieillissement (Morrow *et al.*, 2000).

Des études plus récentes sur un modèle de drosophile sur-exprimant Hsp22 de façon ubiquitaire ou uniquement dans les motoneurones ont également mis en évidence une augmentation de la durée de vie (supérieure à 30%) chez ces insectes. De plus, cette sur-expression permet le maintien d'une activité locomotrice plus longue et confère une résistance accrue à différents types de stress : un stress thermique ou un stress oxydant induit par le paraquat (Morrow *et al.*, 2004b). A l'inverse, dans un modèle de drosophile n'exprimant pas Hsp22 la durée de vie de ces insectes est réduite ce qui s'accompagne d'une diminution plus rapide de l'activité locomotrice et d'une susceptibilité accrue à un stress thermique modéré (Morrow *et al.*, 2004a). Les auteurs suggèrent l'importance d'Hsp22 dans le maintien et l'intégrité de la mitochondrie, organite très sensible au stress et au vieillissement. Ces résultats soulignent le rôle clé joué par Hsp22 dans les mécanismes de protection cellulaire contre le stress oxydant et le vieillissement chez la drosophile ainsi que le rôle majeur de la mitochondrie dans le vieillissement.

Par ailleurs, des analyses du génome entier ont été réalisées sur le modèle drosophile sur-exprimant Hsp22 ainsi que sur des drosophiles sauvages puis comparées entre elles. La sur-expression d'Hsp22 induit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse protéique et dans la production énergétique par la mitochondrie (qui sont normalement diminués avec l'âge) et notamment des gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci suggère que l'homéostasie mitochondriale pourrait jouer un rôle central dans l'augmentation de la durée de vie induite par Hsp22 (Kim *et al.*, 2010). Enfin l'insertion du gène drosophile DmHsp22 dans des fibroblastes humains permet d'augmenter leur durée de vie et diminue l'expression d'un marqueur de sénescence, la  $\beta$ -galactosidase (Wadhwa *et al.*, 2010). Ces auteurs ont également montré que DmHsp22 interagit et inactive le suppresseur de tumeur p53 ce qui pourrait expliquer les effets de DmHsp22 dans ce modèle.

Les nombreuses études sur le rôle d'Hsp22 et le vieillissement chez la drosophile nous indiquent que cette protéine empêche le vieillissement et plusieurs d'entre elles suggèrent que cette propriété serait liée à une protection de la mitochondrie.

#### 4.2 Hsp22 et cancer (Aurelian *et al.*, 2012)

La protéine Hsp22 a également été étudiée dans le contexte du cancer. Lors de l'étude qui a mené à sa découverte, les auteurs ont montré que des cellules transfectées sur-exprimant Hsp22 acquièrent une croissance indépendante de l'ancrage. Ils ont ensuite mis en évidence qu'Hsp22 est sur-exprimée dans des cellules de mélanomes par rapport à des mélanocytes normaux, qu'elle est phosphorylée et présente une activité protéine kinase. Enfin, l'utilisation d'un antisens, qui diminue l'expression d'Hsp22, a des effets inhibiteurs sur la croissance de ces mélanomes (Smith *et al.*, 2000). De même, dans des kératinocytes humains en culture, l'inhibition d'Hsp22 réduit la synthèse d'ADN ainsi que la prolifération (Aurelian *et al.*, 2001).

Plus récemment, il a été montré que l'insertion du gène drosophile codant pour la protéine Hsp22 dans des cellules cancéreuses humaines (ostéosarcome, carcinome du sein ou du poumon) accroît la malignité de ces cellules en augmentant leur croissance indépendamment de l'ancrage, de la résistance aux antibiotiques et de la formation de tumeur chez les souris *nude* (Wadhwa *et al.*, 2010).

Une autre étude qui a quantifié Hsp22 dans différents cancers a au contraire mis en évidence une diminution du taux d'Hsp22 dans la plupart des cancers du côlon, du sein, de la



prostate et dans les mélanomes mais une augmentation d'Hsp22 a été observée dans les cancers de l'estomac. La diminution d'Hsp22 est consécutive à des méthylations aberrantes de l'ADN au niveau du promoteur du gène Hsp22 et la réexpression d'Hsp22 dans des cellules cancéreuses permet d'induire l'apoptose *via* la caspase 3 et la voie P38-MAPK (Gober *et al.*, 2003). Une autre étude a confirmé qu'une augmentation des méthylations de l'ADN au niveau du promoteur d'Hsp22 est retrouvée dans 60-75% des mélanomes et *nævi* atypiques mais pas dans les cellules saines de peau ou dans des *nævi* bénins. De plus ces méthylations sont inversement corrélées avec l'expression d'Hsp22 (Sharma *et al.*, 2006). La réexpression d'Hsp22 induit la mort de mélanomes génétiquement induits et limite la croissance tumorale *via* l'action sur différentes voies de mort cellulaire qui sont initiées par la phosphorylation de la protéine *transforming growth factor β-activated kinase 1* ou TAK1 par Hsp22. Ces voies incluent 1) l'activation de la caspase-1, 2) l'augmentation de Beclin-1 *via* la phosphorylation de mTOR et 3) l'apoptose causée par le clivage de Beclin-1 induit par la caspase-1 (Smith *et al.*, 2012). Enfin, dans des glioblastomes, l'inactivation du gène codant la Hsp22 induit une forte augmentation de la protéine Sam68 ce qui stimule la prolifération. La quantité de Sam68 est inversement proportionnelle à la quantité d'Hsp22 (Modem *et al.*, 2011).

La dérégulation d'Hsp22 dans la plupart des cancers ainsi que sa capacité à induire la mort des cellules tumorales lors de la restauration de son expression font d'Hsp22 un suppresseur de tumeur. Tout comme les autres suppresseurs de tumeur, ses effets sont différents d'un type cellulaire à un autre et une simple mutation faux-sens W51C est responsable d'une croissance indépendante de l'ancrage.

# Objectifs

Nous avons souligné l'importance de développer des stratégies cardioprotectrices complémentaires dans les chapitres précédents. La stratégie innovante que nous avons plus particulièrement étudiée dans ce travail est la surexpression myocardique de la protéine Hsp22. Si des études précédentes ont permis de valider cette approche en montrant que cette stratégie est capable de protéger le myocarde aussi puissamment que le préconditionnement ischémique, les mécanismes impliqués dans cet effet n'ont pas été totalement élucidés et le rôle de la mitochondrie, composante clé des différentes stratégies cardioprotectrices, n'a pas encore été étudié.

Il a également été montré que la surexpression d'Hsp22 induit la croissance cellulaire et une hypertrophie du myocarde or les ERO participent à l'activation des voies de survie lors du processus de préconditionnement et peuvent également induire une hypertrophie.

C'est pourquoi nous avons fait l'hypothèse dans ce travail que l'effet cardioprotecteur conféré par Hsp22 pourrait être dû à des effets directs ou indirects sur les fonctions mitochondriales et que les espèces réactives de l'oxygène pourraient être l'un des médiateurs des effets d'Hsp22.

Les objectifs de ce travail ont donc été :

- ➔ D'étudier sur un modèle murin de surexpression myocardique de la protéine Hsp22, les fonctions mitochondriales à l'état de base et après un stress ischémique. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle d'anoxie-réoxygénation sur mitochondries isolées puis un modèle d'ischémie-reperfusion régionale sur animal entier.
- ➔ D'étudier le rôle des espèces réactives de l'oxygène dans les différents effets induits par la surexpression de la protéine Hsp22.

# **PARTIE II : METHODOLOGIE ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX**

## 1 Modèle murin

L'étude a été réalisée sur des souris de lignée *Friend Virus B* (FVB) sur-exprimant ou non la protéine Hsp22 humaine spécifiquement dans le myocarde. Ces animaux ont été élevés dans l'animalerie conventionnelle de type A1 commune à la Faculté de Médecine de Créteil et à l'Institut Fédératif Mondor de Médecine Moléculaire de l'Université Paris-Est Créteil. Leur environnement a été maintenu à une température ambiante de 20-24°C et un degré d'hygrométrie ambiante de 45-65% avec un cycle nyctéméral de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux ont été nourris avec des granulés (SAFE A03) et de l'eau *ad libitum*. Les souris ont été étudiées à l'âge de 10 à 12 semaines ou 25-30 semaines selon les protocoles.

Tous les animaux ont été utilisés conformément aux directives du conseil de la communauté européenne (2010/63/EU), aux recommandations du Ministère Français de l'Agriculture concernant la législation relative à l'expérimentation animale (Agrément n°94-043-12) et avec l'avis favorable du comité d'éthique ComEth Afssa/ENVA/UPEC (avis n° 09/10/12-5).



Figure 18 : Photographie d'une souris transgénique (grise) et d'une souris sauvage (blanche).

### 1.1 Description du modèle

Le modèle transgénique (FVB-Hsp22) a été généreusement fourni par le Dr C. Depré (New Jersey Medical School, Newark, Etats-Unis). Ces souris sur-expriment spécifiquement dans le myocarde la protéine Hsp22 (niveau d'expression multiplié par 7 à 9 par rapport à une souris sauvage FVB-WT). En effet, le transgène (gène humain de la Hsp22) est sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde  $\alpha$  de la myosine ( $\alpha$ MHC) spécifique du tissu

cardiaque. De plus, le transgène est accolé, en C-terminal, à la séquence de l'hémagglutinine permettant d'étiqueter la protéine Hsp22 (« HAtag »).



Figure 19 : Représentation schématique de la cassette du transgène. La séquence codant la protéine Hsp22 humaine est précédée du promoteur  $\alpha$ MHC et suivie de la séquence du gène codant l'hémagglutinine.

## 1.2 Génotypage

Pour vérifier la présence du transgène au sein du génome des animaux, la séquence du gène Hsp22 a été amplifiée par *polymerase chain reaction* (PCR) à partir d'ADN génomique extrait des queues de souris à l'aide du kit *Redextract-N-Amp Tissue PCR kit* (Sigma-Aldrich®). Celles-ci ont préalablement été prélevées lors du sevrage et de la numérotation des animaux. Le génotypage a été réalisé en 3 étapes : l'extraction de l'ADN, l'amplification par PCR du transgène et la migration des produits de PCR par électrophorèse. L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir de 0,5 cm de queue. Le morceau de queue a été placé dans un microtube (1,5 ml) puis 100  $\mu$ l d'*Extraction Solution* et 25  $\mu$ l de *Tissue Preparation* ont été ajoutés. La solution a ensuite été vigoureusement agitée avant d'être incubée 10 min à température ambiante puis 3 min à 95°C. 100  $\mu$ l de *Neutralization Solution* ont été ajoutés à cette solution pour stopper la réaction. Les extraits d'ADN obtenus ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

L'amplification du transgène a été réalisée par PCR à l'aide des amorces dont les caractéristiques sont les suivantes : l'amorce sens (séquence : 5'ATGACAGACATCCCTCCTA3'), dont la température de fusion est de 69°C et le poids moléculaire est de 6320,2 g/mol, est spécifique du promoteur  $\alpha$ MHC ; l'amorce antisens (séquence : 5'GTCGACTCAAGCGTAATCTGGTACGT3'), dont la température de fusion est de 76°C et le poids moléculaire est de 7987,2 g/mol, est spécifique de l'étiquette hémagglutinine. Pour chaque échantillon, le mélange réactionnel a été préparé en introduisant dans un microtube (200  $\mu$ l) 10  $\mu$ l d'*Extract-N-Amp PCR reaction mix* (contenant la Taq polymérase ainsi que son tampon, les dNTPs et du  $MgCl_2$ ), 0,8  $\mu$ l d'amorce sens (10  $\mu$ M), 0,8  $\mu$ l d'amorce antisens (10  $\mu$ M), 4  $\mu$ l d'extrait d'ADN et de l'eau (qsp 20  $\mu$ l). Les paramètres indiqués dans le tableau 1 ont été utilisés pour l'amplification par PCR.

	Température (°C)	durée	nombre de cycles
dénaturation	94	3 min	1
dénaturation	94	30 s	30
Hybridation	64	30 s	
Elongation	72	1 min	
Elongation	72	10 min	1

Tableau 1 : Paramètres de PCR utilisés pour amplifier le gène H11K.

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 1% (contenant 5 µl/100 ml de bromure d'éthidium) afin de les faire migrer par électrophorèse. Pour chaque échantillon, 15 µl de produit de PCR additionnés de 5 µl de bleu de charge *Blue Juice* (Invitrogen®) ont été déposés dans un puits du gel. Le marqueur de taille 100 *pb DNA Ladder* (Invitrogen®) a également été déposé. La migration a été réalisée à 100 V pendant 1 heure dans une cuve contenant un tampon Tris-Acétate (40 mM), EDTA (1mM). L'utilisation d'une lumière UV a ensuite permis la visualisation des fragments amplifiés dont la taille approximative a été déterminée par comparaison aux bandes obtenues pour le marqueur de taille.

### 1.3 Evaluation de l'hypertrophie ventriculaire

L'hypertrophie du ventricule gauche a été évaluée en calculant le rapport du poids du ventricule gauche sur la longueur tibiale (VG/LT en mg/mm).

### 1.4 Traitements

#### 1.4.1 Le L-N<sup>ω</sup>-Nitroarginine methyl ester (L-NAME)

Le L-NAME (Sigma-Aldrich®), inhibiteur des NOS, a été administré par voie intrapéritonéale, toutes les 24 heures pendant 3 jours, à une dose de 20 mg/kg (Zarrindast *et al.*, 2006) et les souris ont été sacrifiées 12 heures après la dernière injection. Les souris témoins ont reçu des injections de NaCl 0,9% selon le même protocole, avec un volume correspondant à celui injecté aux souris traitées par le L-NAME.

#### 1.4.2 Le 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol)

Le Tempol (Sigma-Aldrich®), molécule de type SOD mimétique a été administré quotidiennement par gavage (100 mg/kg/jour) depuis le sevrage jusqu'au sacrifice. Il

présente l'avantage d'être soluble dans l'eau, perméable aux membranes, de faible toxicité et lipophile.

## **2 Modèle d'ischémie-reperfusion régionale myocardique chez la souris anesthésiée**

### **2.1 Préparation des animaux**

Les souris ont été pesées puis anesthésiées par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (CEVA<sup>®</sup> Santé animale) à la dose de 100 mg/kg. Une fois endormies, elles ont été rasées au niveau du cou et du thorax puis ces zones ont été désinfectées avec de la Vétédine<sup>®</sup> (Vétoquinol<sup>®</sup>). Elles ont été placées sur un tapis chauffant qui permet de maintenir constante la température corporelle à 37°C, puis intubées avec une sonde endotrachéale permettant de les placer sous assistance respiratoire à l'aide d'un respirateur (Minivent Type 845, Harvard<sup>®</sup> Apparatus) raccordé à une bouteille de carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). Le respirateur a été programmé pour injecter un volume respiratoire de 200 µL à une fréquence de 120 insufflations par minute. 2,5 UI d'héparine ont alors été injectés en intrapéritonéal et les animaux ont été placés en position de décubitus dorsal.

### **2.2 Procédure chirurgicale d'ischémie-reperfusion myocardique**

L'ensemble de la procédure chirurgicale a été réalisée sous loupe binoculaire Leica MZ7.5 (Leica<sup>®</sup> Microsystèmes). Une thoracotomie latérale gauche a été réalisée au niveau du 4<sup>ème</sup> espace intercostal puis le péricarde a été déchiré permettant d'exposer le myocarde. L'artère coronaire descendante gauche a été visualisée et un fil de ligature (Prolène 7-0, Ethicon<sup>®</sup>) a été passé autour de celle-ci. Les extrémités du fil ont ensuite été introduites au travers d'un tube en polyéthylène pour former un lacet. L'occlusion coronaire a été obtenue par serrage du lacet et maintenue à l'aide d'un porte-aiguille. La réalité de l'occlusion a été immédiatement vérifiée par l'observation d'une coloration blanche de la zone située en aval de la ligature. A l'issue de la période d'ischémie, le porte-aiguille et le tube ont été retirés pour permettre la reperfusion de la zone ischémiée qui a été confirmée par la recoloration du tissu myocardique. Un nœud lâche a été réalisé avec le fil de ligature pour servir de guide lors du prélèvement ultérieur du myocarde ou lors de la détermination de la taille de l'infarctus. Pour une durée de reperfusion courte (15 min), une compresse stérile a été disposée sur les parties incisées. Pour une durée de reperfusion longue (24 heures), les

parties incisées ont été recousues (Prolène 6-0, Ethicon®) et le pneumothorax a été évacué. Les sutures ont été recouvertes de Vétédine® et les animaux ont été placés en position dorsale. Le ventilateur a ensuite été déconnecté pour permettre la reprise d'une respiration spontanée et les animaux ont été placés dans une chambre thermostatée jusqu'à leur éveil et leur extubation spontanée. Ils ont alors reçu une injection d'un algésique : le temgésic® (buprénorphine, 0,1 mg/kg par voie sous-cutanée).

### 2.3 Evaluation de la taille de l'infarctus

Après 24 heures de reperfusion, les souris ont été anesthésiées de nouveau avec du pentobarbital sodique (100 mg/kg), intubées et ventilées artificiellement dans les mêmes conditions que la veille. Le thorax a été rouvert et l'artère coronaire gauche occlue précédemment a été ligaturée définitivement au même endroit que la veille. Une solution de bleu Evans 5% (Sigma-Aldrich®) a alors été injectée dans le myocarde battant par l'apex. La zone myocardique irriguée se colore en bleu et la zone ischémique reste blanche définissant ainsi l'aire à risque (AAR). Le myocarde a alors été prélevé, les oreillettes et le ventricule droit ont été excisés et le ventricule gauche a été pesé puis découpé transversalement en 6 tranches numérotées de C1 (vers la base) à C6 (vers l'apex).

Les 6 coupes ont été photographiées une première fois pour visualiser l'AAR puis elles ont été incubées dans du chlorure de triphényltétrazolium 1% (TTC, Sigma Aldrich®) pendant 5 min à 37°C pour différencier l'aire infarctée (AI) du tissu non atteint. Le TTC (blanc) est réduit par les déshydrogénases tissulaires en formazan (rouge) dans le tissu sain alors que dans le tissu ischémié cette réduction est fortement diminuée voire absente laissant la zone ischémiée en blanc. Après incubation, les tranches ont été placées dans une solution de formol 5% (F1635, Sigma-Aldrich®) pendant 24h afin de fixer les colorations puis elles ont été de nouveau photographiées, séchées et pesées.

Pour chaque tranche, la surface totale, la surface de l'AAR et celle de l'AI ont été déterminées par planimétrie à l'aide du logiciel d'analyse d'images Image J (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Ces valeurs ont ensuite été pondérées par le poids de la tranche correspondante. Pour chaque cœur, l'AAR a été exprimée en fonction du poids du VG et la taille de l'infarctus en fonction de l'AAR selon les formules suivantes :

$$\text{AAR} = \Sigma (\text{masse des AAR}) / \text{Masse du VG}$$

$$\text{AI} = \Sigma (\text{masse des AI}) / \text{Masse de l'AAR}$$



### 3 Etude ex-vivo à partir de mitochondries cardiaques isolées

Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les myocards ont immédiatement été prélevés et rincés dans du NaCl 0,9% à 4°C. Les oreillettes et le ventricule droit ont été éliminés. Pour les cœurs des souris ayant subi une ischémie-reperfusion, la partie du myocarde correspondant à l'AAR a été prélevée, en se servant du fil de ligature laissé lors de la procédure de chirurgie pour délimiter cette zone, puis rincée dans du NaCl 0,9% à 4°C.

#### 3.1 Préparation des extraits mitochondriaux

L'ensemble de la procédure d'extraction des mitochondries a été réalisée sur glace, à 4°C. Le ventricule gauche a été pesé et émincé finement à l'aide d'un scalpel sur une plaque en inox. La préparation a ensuite été déposée dans un tube contenant du tampon dit « tampon d'homogénéisation » (saccharose 70 mM, HEPES 10 mM, mannitol 220 mM, EGTA 2 mM, pH=7,4 à 4°C, 10 ml par cœur) et les morceaux ont été écharpés par 3 fois 50 coups de ciseaux à bouts ronds. Le broyat a alors été homogénéisé par 4 allers-retours du piston d'un Potter-Elvehjem motorisé (1500 tours/min). L'homogénat a été centrifugé à 1000 *g* pendant 5 min à 4°C, puis le surnageant S1 (contenant les mitochondries) a été récupéré et centrifugé à 10000 *g* pendant 10 min à 4°C. Le surnageant S2 a été utilisé pour l'étude de l'activité de la NADPH oxydase, de la xanthine oxydase ainsi que pour l'étude de l'expression des protéines cytosoliques/membranaires tandis que le culot C2 contenant les mitochondries a été remis en suspension dans 50 µL de tampon de reprise (saccharose 70 mM, HEPES 10mM, mannitol 220 mM, EGTA 0,01 mM).

#### 3.2 Dosage des protéines mitochondriales

Pour étudier l'expression des protéines mitochondriales par western-blot, les protéines ont été dosées avec un kit de dosage *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific®). Les échantillons mitochondriaux ont été dilués au 1/10<sup>e</sup> dans du *dubelcco's phosphate buffer saline* (DPBS, Gibco) puis 10 µL ont été déposés dans une microplaque 96 puits selon la procédure décrite dans la notice du kit. De l'albumine sérique bovine (BSA) à différentes concentrations a été utilisée pour établir une courbe d'étalonnage. Après une incubation de 30 min à 37°C, l'absorbance a été lue dans un spectrophotomètre (Appliskan®, Thermo Scientific®) à 560 nm contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions.

Dans les expériences nécessitant des mitochondries fraîchement isolées telles que l'étude de la fonction respiratoire mitochondriale, les concentrations protéiques ont été déterminées par une méthode turbidimétrique corrélée à la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

### 3.3 Modèle in vitro d'hypoxie-réoxygénation sur mitochondries isolées

Les mitochondries isolées (0,4 mg/mL) ont été placées dans du tampon de respiration préalablement bullé avec de l'azote et incubées à 30°C pendant 5 min en présence d'un flux constant d'azote à la surface de cette solution. La réoxygénation a été induite par arrêt du flux gazeux et ajout de tampon de respiration oxygéné et après 1 min d'incubation, la phosphorylation oxydative ou la production d'ERO ont été mesurées.

### 3.4 Etude de la fonction respiratoire mitochondriale

#### 3.4.1 Etude de la respiration mitochondriale

L'étude de la respiration a été réalisée par polarographie grâce à une électrode de Clark (*Microcathode Oxygen Electrode*, Strathkelvin®) qui mesure la quantité d'oxygène présente dans le milieu. Les mesures ont été effectuées dans une cuve thermostatée à 30°C dans un volume total de 100 µL contenant l'extrait mitochondrial (0,4 mg/ml) et du tampon de respiration (KCl 100 mM, sucrose 50 mM, HEPES 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, pH 7,4 à 30°C), sous agitation constante. La respiration a été initiée par l'ajout de différents substrats :

- des substrats glucidiques : du pyruvate/malate (2,5 mM chacun) ou du succinate (5 mM),
- un substrat lipidique : le palmitoyl-carnitine (5 µM) en présence de malate (2 mM),

ce qui permet d'obtenir la vitesse de consommation de l'oxygène dépendante du substrat c'est-à-dire la respiration de base (ou stade 2). De l'ADP (1 mM) a ensuite été ajoutée dans la cuve pour induire la synthèse d'ATP ce qui engendre une augmentation de la consommation d'oxygène : c'est le stade 3 (figure 20). Après consommation totale de l'ADP, la consommation d'oxygène diminue pour retrouver une valeur quasi identique à la respiration de base : c'est le stade 4. Enfin, la tyrphostine A9 (1 µM), un agent découplant, a été ajoutée afin d'étudier la chaîne respiratoire lorsqu'elle fonctionne au maximum de ses capacités.

Le rapport stade 3/stade 4 appelé contrôle respiratoire (CR) a ensuite été calculé. Il permet d'évaluer l'état des mitochondries et reflète le couplage entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP.

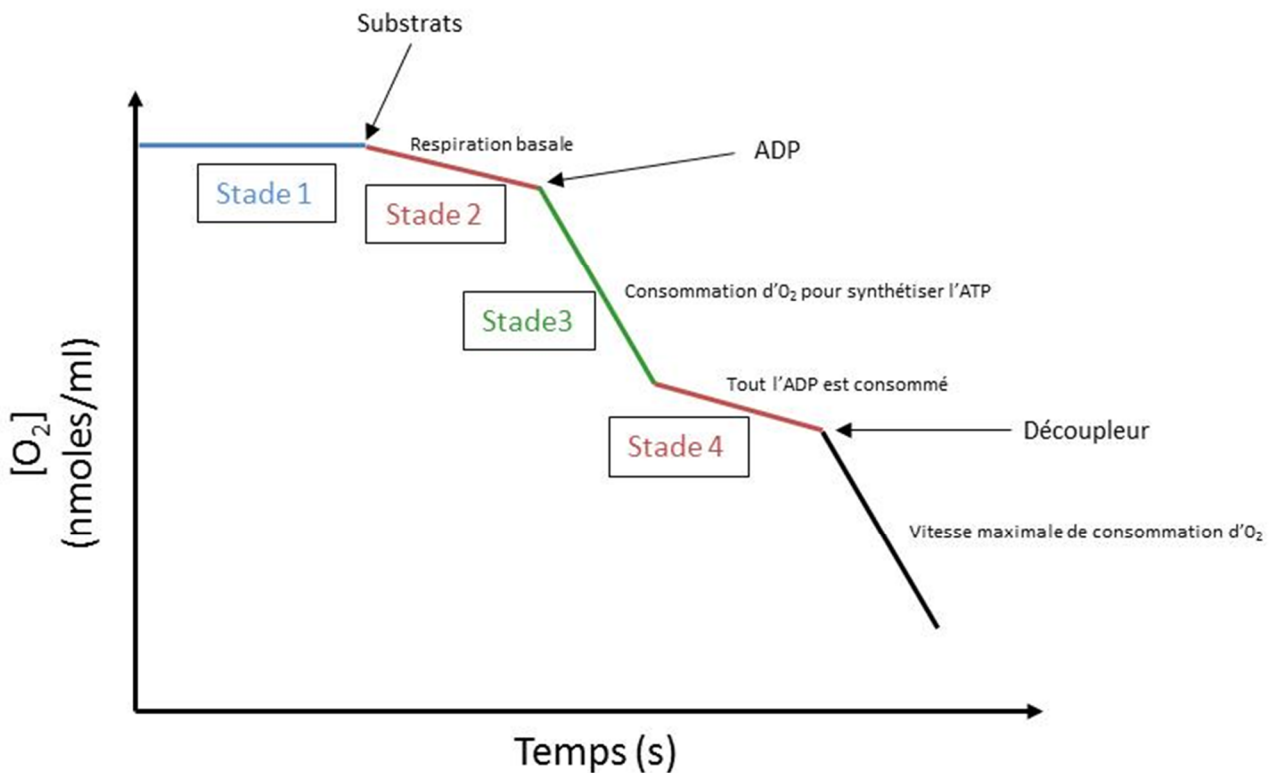


Figure 20 : Consommation d'oxygène par les mitochondries dans différentes conditions. Les mitochondries (0,4 mg/mL) incubées à 30°C (stade 1) consomment l'O<sub>2</sub> lorsque les substrats de la chaîne respiratoire sont ajoutés (stade 2). L'ajout d'ADP (250 μM) stimule la consommation d'oxygène (stade 3) jusqu'à son entière consommation qui induit un retour à la respiration basale (stade 4). L'ajout d'un agent découpleur permet d'évaluer la vitesse maximale de consommation d'O<sub>2</sub> par la chaîne respiratoire.

### 3.4.2 Etude de l'activité des complexes respiratoires

L'étude des activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale est basée sur les travaux de Barrientos (2002). Cette étude a été réalisée par spectrophotométrie (spectrophotomètre V-530, JASCO®), en suivant la diminution ou l'augmentation de l'absorbance d'un substrat ou d'un produit de chacun des différents complexes. Les mitochondries ont tout d'abord subi 3 cycles de congélation/décongélation (-80°C/25°C) afin de les faire éclater. Les mesures ont ensuite été effectuées à 25°C dans un volume final de 1,5 ml. Les résultats obtenus via le logiciel Spectra Manager ont été convertis en nmol/min/mg de protéines mitochondriales grâce à la loi de Beer-Lambert.

#### 3.4.4.1 Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase)

Pour mesurer l'activité du complexe I, la diminution de l'absorbance du NADH ( $\epsilon=6810 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) provoquée par son oxydation en  $\text{NAD}^+$  a été suivie ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) pendant 600 secondes.

Le milieu réactionnel comprend : un volume adéquat de tampon 1 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25mM,  $\text{MgCl}_2$  5mM, BSA 1 mg/ml, pH=7,4 à 4°C), du KCN (250  $\mu\text{M}$ ), de la décylubiquinone (100  $\mu\text{M}$ ), les mitochondries (0,1 mg/ml) et du NADH (200  $\mu\text{M}$ ). Après le réglage du 0 de l'appareil la mesure a été lancée.

Afin de vérifier que seule l'activité du complexe I est mesurée dans ce protocole, l'expérience a aussi été réalisée en présence d'un inhibiteur du complexe I (roténone 5  $\mu\text{M}$ ).

#### 3.4.4.2 Complexe II (succinate déshydrogénase)

Pour mesurer l'activité du complexe II, la diminution de l'absorbance provoquée par la réduction d'un accepteur d'électrons (le 2,6-Dichlorophénol Indophénol ou DCIP,  $\epsilon=21000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) a été suivie ( $\lambda =600 \text{ nm}$ ) pendant 600 secondes.

Le milieu réactionnel comprend : un volume adéquat de tampon 2 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM, EDTA 2 mM, BSA 1 mg/ml, pH=7,4 à 4°C), de la roténone (2  $\mu\text{M}$ ), du KCN (250  $\mu\text{M}$ ) et les mitochondries (0,033 mg/ml). Après 5 minutes d'incubation, le 0 de l'appareil a été réglé, et suite à l'ajout de décylubiquinone (100  $\mu\text{M}$ ) et de DCIP (80  $\mu\text{M}$ ) la mesure a été lancée.

Afin de vérifier que seule l'activité du complexe II est mesurée dans ce protocole, l'expérience a aussi été réalisée en présence d'un inhibiteur du complexe II (malonate 10 mM).

#### 3.4.4.3 Complexe III (ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase)

Pour mesurer l'activité du complexe III, l'augmentation de l'absorbance accompagnant la réduction du cytochrome c oxydé en cytochrome c réduit ( $\epsilon =19000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) a été suivie ( $\lambda =540 \text{ nm}$ ) pendant 400 secondes.

Le milieu réactionnel comprend : un volume adéquat de tampon 2, de la roténone (2  $\mu\text{M}$ ), du KCN (250  $\mu\text{M}$ ), les mitochondries (0,017 mg/ml) et du cytochrome c oxydé (40  $\mu\text{M}$ ). Après le réglage du 0 de l'appareil, du décylubiquinol (100  $\mu\text{M}$ ) a été ajouté et la mesure a été lancée.

Il existe une activité basale indépendante du complexe III due à la réduction du cytochrome c par le décylubiquinol. Elle a été mesurée en inhibant l'activité du complexe III (antimycine 1  $\mu\text{M}$ ) puis retranchée de l'activité totale pour obtenir l'activité spécifique du complexe III.

#### 3.4.4.4 Complexe IV (cytochrome c oxydase)

Pour mesurer l'activité du complexe IV, la diminution de l'absorbance accompagnant l'oxydation du cytochrome c réduit en cytochrome c oxydé a été suivie ( $\lambda=540 \text{ nm}$ ) pendant 200 secondes.

Le milieu réactionnel comprend : un volume adéquat de tampon 3 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM, EDTA 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, BSA 1 mg/ml, pH=7,4 à 4°C) et les mitochondries (0,017 mg/ml). Après 1 min d'incubation, le 0 de l'appareil a été réglé, du cytochrome c réduit (33  $\mu\text{M}$ ) a été ajouté et enfin, la mesure a été lancée.

### 3.4.3 Etude de la production d'ERO

La production d'ERO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est la conséquence de la fuite d'électrons au cours de leur transfert au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale, au niveau des complexes I et III. Ils peuvent alors être captés par l'oxygène formant l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ , qui est ensuite pris en charge par la SOD et transformé en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La mesure de la production d'ERO, par spectrofluorimétrie (spectrofluorimètre FP-6300 JASCO®,  $\lambda_{\text{excitation}}=563$  nm,  $\lambda_{\text{émission}}=587$  nm) repose sur l'apparition d'un substrat fluorescent dont la quantité dans le milieu dépend de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  : la résorufine (voir figure 21).

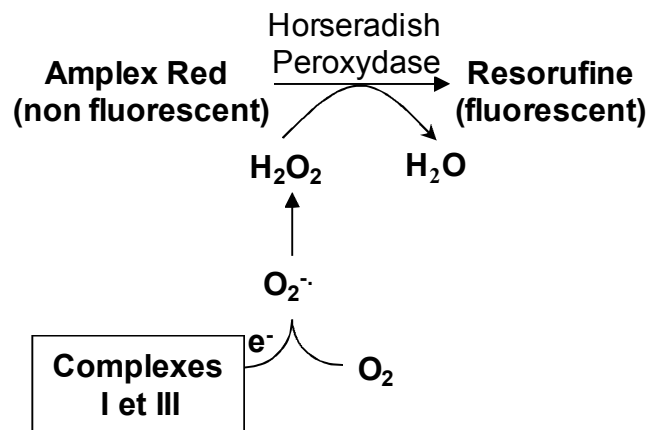


Figure 21 : Représentation schématique de la technique permettant de mesurer la production d'ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les mesures s'effectuent à 30°C dans un volume total de 1 mL. La production d'ERO a été étudiée dans différentes conditions de substrats et en absence ou en présence de différents inhibiteurs. L'Amplex red (10  $\mu\text{M}$ ), la peroxydase de radis noir (1 U/ml) et les mitochondries (0,2 mg/ml) ont été ajoutées dans un volume adéquat de tampon de respiration et la mesure a été déclenchée. Les substrats, pyruvate/malate (5 mM chacun) ou succinate (5 mM), ont ensuite été introduits dans le milieu pour initier la réaction. De la roténone (5  $\mu\text{M}$ ) a été

ajoutée au cours de la mesure pour bloquer le complexe I. Enfin, de l'antimycine (5  $\mu\text{M}$ ) a été ajoutée pour bloquer le complexe III.

### 3.5 Etude du potentiel de membrane mitochondrial

La différence de potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) due au gradient de protons a été évaluée par spectrofluorimétrie à l'aide d'un spectrofluorimètre (FP-6300 JASCO<sup>®</sup>,  $\lambda_{\text{excitation}}=503\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}}=527\text{ nm}$ ), en suivant la fluorescence d'un marqueur chargé positivement, la rhodamine 123 qui pénètre dans la mitochondrie selon le gradient de potentiel. Les mesures ont été effectuées à 30°C dans un volume total de 1 ml. Dans un premier temps, la rhodamine 123 (0,1  $\mu\text{M}$ ) a été introduite dans un volume adéquat de tampon de respiration puis les mitochondries (0,4 mg/ml) et les substrats de la chaîne respiratoire (Pyruvate/Malate 5 mM chacun) ont été ajoutés ce qui génère le potentiel de membrane mitochondrial (la respiration mitochondriale éjectant des protons depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire). A la fin de l'expérience, l'ajout d'un découpleur (tyrphostine A9, 0,1  $\mu\text{M}$ ) permet d'abolir et donc de définir le  $\Delta\Psi\text{m}$  dans les conditions basales de respiration, la différence entre les fluorescences obtenues avant et après le découplage étant corrélée au  $\Delta\Psi\text{m}$ .

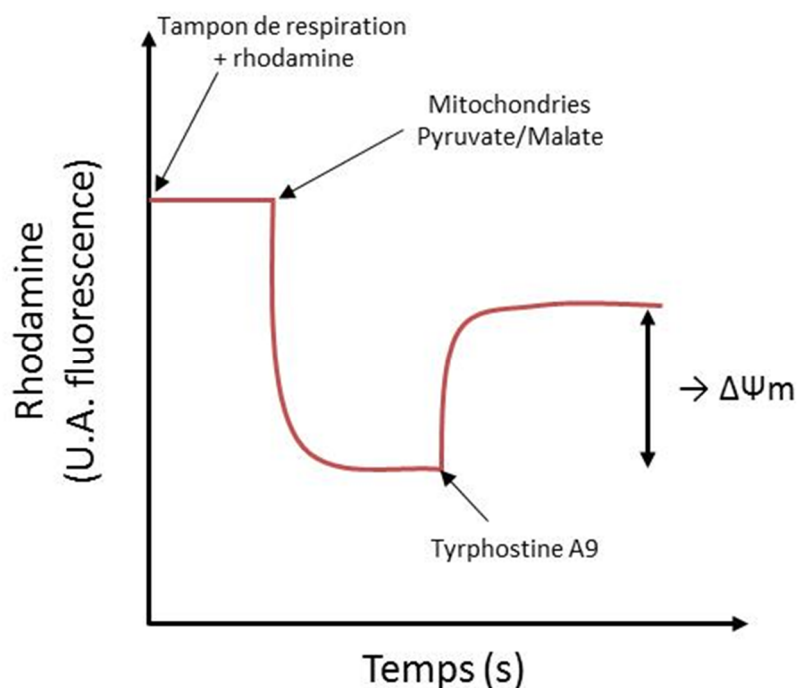


Figure 22 : Mesure du potentiel de membrane de mitochondries isolées au moyen d'une sonde fluorescente, la rhodamine 123. Le potentiel de membrane qui est exprimé en U.A. de fluorescence en fonction du temps est visualisé par la diminution de la fluorescence due à l'absorption de la rhodamine 123 (0,1  $\mu\text{M}$ ) par les mitochondries (0,4 mg/mL). U.A. : unité arbitraire.

### 3.6 Etude de la sensibilité de l'ouverture du mPTP à une surcharge calcique

L'ouverture du mPTP a été analysée en évaluant la capacité de rétention calcique des mitochondries. Ce protocole consiste à ajouter successivement de faibles quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu contenant les mitochondries. Les mitochondries incorporent ce  $\text{Ca}^{2+}$  jusqu'à atteindre un seuil de concentration pour lequel le mPTP s'ouvre et les mitochondries libèrent dans le milieu extérieur le calcium incorporé.

La concentration extramitochondriale de calcium a été suivie par spectrofluorimétrie (Luminescence Spectrometer, Perkin Elmer<sup>®</sup> LS50B ;  $\lambda_{\text{émission}}=532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{excitation}}=506 \text{ nm}$ ). Les mitochondries (0,8 mg/mL) ont été introduites dans du tampon de respiration (volume final de 300  $\mu\text{L}$ ) contenu dans une cuve en quartz maintenue à 30°C sous agitation lente, en présence de pyruvate/malate (2,5 mM chaque) et d'une sonde fluorescente : le *Calcium Green 5-N* (3,3  $\mu\text{M}$ , C3737, Molecular Probes<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>®</sup>). Du calcium (10  $\mu\text{M}$ ) est ensuite ajouté régulièrement jusqu'à l'obtention du seuil marqué par une augmentation brusque et importante de la fluorescence.

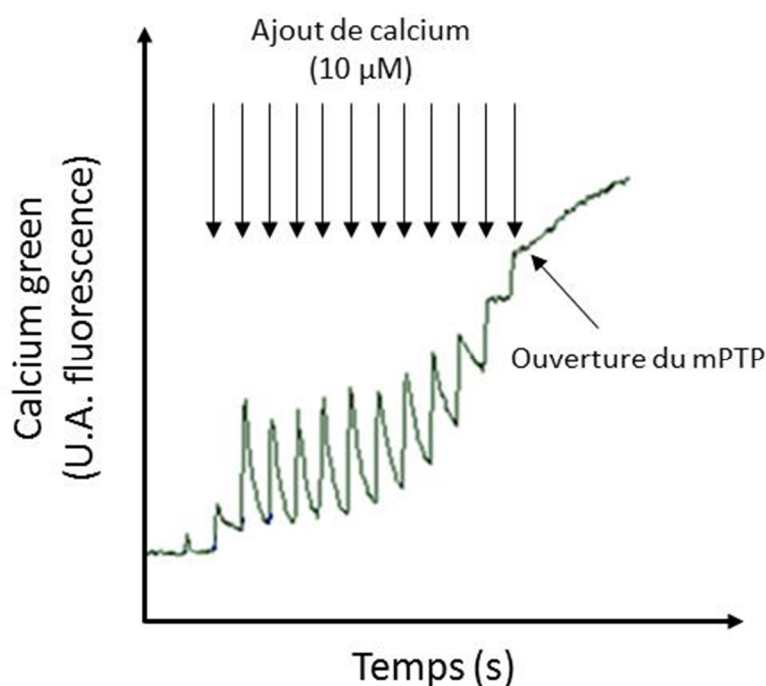


Figure 23 : Mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries traduisant leur résistance à l'ouverture du mPTP. Les mitochondries (0,8 mg/mL) sont incubées à 30°C en présence de calcium green 5-N (3,3  $\mu\text{M}$ ) et chargées par l'ajout de *quanta* de calcium (10  $\mu\text{M}$  chacun) jusqu'à l'ouverture du mPTP.

### 3.7 Etude du gonflement mitochondrial induit par le $\text{Ca}^{2+}$

Le gonflement mitochondrial a été étudié en mesurant la modification d'absorbance du milieu contenant les mitochondries à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Jasco® V-530). Les mitochondries (0,4 mg/mL) ont été incubées en présence de substrats (pyruvate/malate 5 mM chacun) pendant 1 min puis le gonflement mitochondrial a été induit par l'ajout de concentrations croissantes de calcium (50, 100, 200 et 500  $\mu\text{M}$ ).

### 3.8 Etude de la production de NO

La production de NO par des mitochondries cardiaques fraîchement isolées a été étudiée par spectrofluorimétrie (spectrofluorimètre Jasco® FP-6300,  $\lambda_{\text{émission}}=415$  nm,  $\lambda_{\text{excitation}}=495$  nm) à l'aide d'une sonde fluorescente : la diaminofluorescéine-FM (DAF-FM) (Leite *et al.*, 2010). Les mitochondries (0,5 mg/ml) ont été incubées dans du tampon de respiration contenant du calcium (50 mM), du DAF-FM (50 mM), de la SOD (250 U/mL) et de la catalase (350 U/mL) pour prévenir une interférence éventuelle de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La production de NO a été évaluée à 37°C. La spécificité du DAF a été testée en ajoutant des concentrations croissantes d'un donneur de NO, le diéthylamine NONOate (relâchant 1,5 moles de NO par mole de composé) ce qui a entraîné une augmentation rapide et linéaire de la fluorescence. Des quantités connues de NONOate ont été utilisées pour générer des courbes étalons et calculer la vitesse de production du NO en nmol/min/mg de protéines mitochondriales.

## 4 Etude de l'expression de protéines

### 4.1 Western-Blot

L'expression des protéines STAT3, iNOS, PKC $\epsilon$ , NADPH oxydase, Akt, pAkt, AMPK, pAMPK, VDAC,  $\beta$ -actine ainsi que l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été évaluées dans les fractions mitochondriales et/ou cytosoliques par western-blot (WB).

Après dosage, les échantillons protéiques ont été dénaturés par chauffage à 80°C pendant 5 min en présence de bleu Laemmli (S3401, Sigma-Aldrich®) puis un volume correspondant à 20  $\mu\text{g}$  de protéines a été déposé, en même temps qu'un marqueur de poids moléculaire dans des gels de dodécyl sulfate de sodium polyacrylamide (SDS-PAGE) avec une concentration en acrylamide de 8%, 10% ou 15 % selon le poids moléculaire de la protéine à étudier. Les protéines ont été séparées en fonction de leur poids moléculaire par



électrophorèse grâce au système de migration *Mini Protean Tetracell* (Bio-rad<sup>®</sup> Laboratories), 10 min à 80V puis 1h à 120V dans du tampon de migration (Tris-base 50 mM, glycine 380 mM, SDS 0,1%, EDTA 7,7%).

Les protéines ont ensuite été transférées par électrophorèse sur des membranes de PVDF (polyvinylidène) à l'aide du système *Criterion Blotter* (Bio-rad Laboratories) dans du tampon de transfert (Tris-base 48 mM, glycine, 39 mM, +20% éthanol, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), à un voltage de 100 V pendant une heure. Les protéines présentes sur la membrane ont alors été colorées avec le Rouge Ponceau (0,1%) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) pour s'assurer de la qualité du transfert.

Pour saturer les sites non spécifiques, les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de Tris 1 mM, NaCl 10 mM comprenant 0,1% de Tween 20 (P5927, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), pH 7,5 à 25°C (TBS-T) et du lait écrémé 5% (Régilait<sup>®</sup>) pendant 1h à température ambiante sous agitation douce. Selon la protéine étudiée, les membranes ont ensuite été incubées sous agitation lente en présence de l'anticorps primaire correspondant : STAT3 dilué au 1/2000<sup>ème</sup>, PBR au 1/2000<sup>ème</sup>, VDAC au 1/2000<sup>ème</sup>, iNOS au 1/1000<sup>ème</sup>, PKCε au 1/1000<sup>ème</sup>, NADPH oxydase au 1/2000<sup>ème</sup>, Akt au 1/2000<sup>ème</sup>, pAkt (Ser 473) au 1/2000<sup>ème</sup>, le mélange d'anticorps issu du kit OXPPOS au 1/1000<sup>ème</sup>. Les membranes ont ensuite été rincées par 4 lavages successifs de 5 min à température ambiante dans une solution de TBS-T sous agitation forte puis incubées avec l'anticorps secondaire correspondant à l'épitope des anticorps primaires, dilués au 1/5000<sup>ème</sup> dans du TBS-T contenant 5% de lait écrémé (*goat anti-mouse* IgG-HRP, sc-2005 ; Santa Cruz<sup>®</sup> Biotechnology ; *donkey anti-goat* IgG-HRP, sc-2020, Santa Cruz<sup>®</sup> Biotechnology ; *goat anti-rabbit* IgG HRP, #7074, Cell Signaling<sup>®</sup>) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation douce.

Les protéines ont été révélées à l'aide du kit de révélation *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (32106, Thermo Scientific<sup>®</sup>) : les membranes ont été incubées 1 min avec le réactif de chimioluminescence puis après égouttage, introduite dans un appareil G:box Chemi XT4 (Syngene<sup>®</sup>) permettant la détection de la chimioluminescence. L'intensité de chaque bande a été analysée à l'aide du logiciel *Genetools* (Syngene<sup>®</sup>) pour déterminer la quantité relative des protéines.

Pour vérifier la charge protéique des échantillons, chaque membrane a été déshybridée à l'aide du mélange *Restore Western Blot Stripping Buffer* (21059, Thermo Scientific<sup>®</sup>) puis réhybridée avec la protéine normalisatrice VDAC pour les fractions

mitochondriales ou actine pour les fractions contenant le cytosol et les membranes (même protocole que précédemment).

#### 4.2 PCR quantitative

Après extraction des ARN totaux cardiaques, l'étude de l'expression des protéines impliquées dans les mécanismes de sénescence a été effectuée en deux temps : 1) une transcription inverse des ARNm précédemment extraits en ADN complémentaires, puis 2) une PCR quantitative en temps réel.

##### 4.2.1 Extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à l'aide du kit *RNeasy Fibrous tissue minikit* (QIAGEN®) selon le protocole établi par le fournisseur. La pureté et la quantité des ARN obtenues ont ensuite été évaluées par spectrophotométrie (Jasco V-530). Chaque extrait d'ARN a été dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du tampon Tris-HCl 10mM à pH 7,5 et l'absorbance à 260 nm (A<sub>260</sub>) de cette solution a été mesurée. La concentration en ARN (µg/mL) a été calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Concentration en ARN} = 44 \times A_{260} \times 200 \text{ (facteur de dilution)}$$

La pureté des ARN a été évaluée en calculant le rapport de l'absorbance à 260 nm (absorbance des ARN) et à 280 nm (absorbance des protéines). Les extraits d'ARN ont été considérés comme purs lorsque le rapport était compris entre 1,9 et 2,1.

##### 4.2.2 Transcription inverse

La transcription inverse des ARN en ADNc a été réalisée à l'aide du kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR* (Invitrogen®) selon le protocole établi par le fournisseur.

##### 4.2.3 PCR quantitative en temps réel

La qPCR a été réalisée à l'aide du kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX* (Invitrogen®). Le mélange réactionnel (2,5µl) était constitué de tampon de réaction, de 10 ng d'ADNc précédemment obtenu, des amorces sens et antisens (Invitrogen®) à la concentration finale de 350 nM dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.

Nom	Séquence 5' - 3'	% GC	Tf
Trp53 R	TCC GAC TGT GAC TCC TCC AT	55	49
Trp53 L	CTA GCA TTC AGG CCC TCA TC	55	49
P16-W-sens	ACG GTG CAG ATT CGA ACT GC	55	49
P16-W-anti	TAC ACA AAG ACC ACC CAG CG	55	49
Cdkn1a/p21 R	ACG GGA CCG AAG AGA CAA C	57	48
Cdkn1a/p21 L	CAG ATC CAC AGC GAT ATC CA	50	47
Cdkn2a/p19 R	TCG AAT CTG CAC CGT AGT TG	50	47
Cdkn2a/p19 L	GCT CTG GCT TTC GTG AAC AT	50	47

Tableau 2 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la qPCR. Les noms et séquences des amorces sont indiqués, ainsi que le pourcentage de bases G et C et la température de fusion (Tf).

Les valeurs ont été obtenues en cycle seuil (ou Ct pour *cycle threshold*), correspondant au nombre de cycles de PCR nécessaires pour dépasser un seuil de fluorescence prédéfini. La méthode de calcul utilisée pour normaliser les résultats se décompose en trois étapes. La première étape consiste à normaliser l'expression du gène cible par rapport à celle d'un gène de référence ayant une expression ubiquitaire et constante selon les conditions. Le gène de référence qui a été utilisé pour ces qPCR est le gène codant l'ARN ribosomal 18s.

$$\Delta Ct_{\text{échantillon } \alpha} = Ct_{\text{gène cible } \alpha} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

La deuxième étape consiste à normaliser l'expression de notre échantillon par rapport à l'expression d'un échantillon calibrateur qui est utilisé pour chaque mesure en qPCR réalisée. En normalisant les échantillons par rapport à cet échantillon calibrateur, il a été possible de comparer entre elles les différentes mesures réalisées en qPCR.

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon } \alpha} - \Delta Ct_{\text{calibrateur}}$$

Enfin, la dernière étape est la détermination de la quantité d'ARN exprimée pour un échantillon en unité arbitraire (UA) :

$$\text{Quantité d'ARN (UA)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

## 5 Etude du stress oxydant

### 5.1 GSH/GSSG

La mesure du rapport GSH/GSSG a été réalisée selon le protocole décrit par Rahman *et al.* (2006). L'ensemble des produits utilisés ont été dilués dans un tampon phosphate appelé KPE ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  84 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  16 mM, 0,1 M EDTA, pH 7,5). Après sacrifice et excision du myocarde, 10 mg de ventricule gauche ont immédiatement été placés dans 1 mL d'acide sulfosalicylique (préparé à 2% dans du KPE) puis homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur disperseur ultra turrax (Basic T10, Ika®). Après centrifugation (10000 *g* pendant 5 min) le surnageant a été séparé en deux parties, l'une pour mesurer le GSH total et l'autre le GSSG. L'échantillon GSSG a été traité pour éliminer le GSH en ajoutant de la 2-Vinylpyridine diluée au  $1/10^{\text{ème}}$  dans du KPE puis après 1 h d'incubation, du triéthanolamine dilué au  $1/6^{\text{ème}}$  a été ajouté pour neutraliser l'excédent de 2-Vinylpyridine.

La mesure a ensuite été réalisée par spectrophotométrie à 412 nm, à 30°C, sous agitation constante et pendant 300 s. L'échantillon dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  a été ajouté dans une cuve en quartz contenant du KPE (qsp 980  $\mu\text{L}$ ), puis du 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) (ou DTNB, 100  $\mu\text{M}$ ) et la glutathion réductase (0,2 U) ont été ajoutés à la cuve. Après 30 s d'incubation, la réaction a été déclenchée par l'ajout de NADPH (50  $\mu\text{M}$ ) et la pente de la droite obtenue a été calculée. Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions que les échantillons mais en absence de tissu.

Enfin, l'utilisation de solutions standards contenant des concentrations croissantes et connues de GSH ou GSSG ont permis d'établir les droites d'étalonnage servant à déterminer les concentrations des échantillons testés.

### 5.2 Mesure de l'activité de la NADPH oxydase

L'activité de la NADPH oxydase a été mesurée grâce au nitrobleu de tétrazolium (NBT) qui est réduit en formazan par l' $\text{O}_2^-$  produit par la NADPH oxydase. L'échantillon (1 mg/mL) a été introduit dans du DPBS (volume final 1 mL) contenu dans une cuve en quartz maintenue à 30°C sous agitation lente en présence de NADPH (20 mM). L'apparition de formazan a été mesurée par spectrophotométrie (560 nm) en calculant la pente de la courbe obtenue. Pour mesurer la réduction non spécifique du NBT, le même protocole a été utilisé mais en présence d'apocynine (inhibiteur de la NADPH oxydase, 1 mM) ou de tempol (1 mM) et la pente de la droite obtenue a été soustraite à celle obtenue sans inhibiteur afin de déterminer l'activité spécifique de la NADPH oxydase.

### 5.3 Mesure de l'activité de la xanthine oxydase

L'activité de la xanthine oxydase a été évaluée en mesurant la production d'acide urique, produit de la dégradation de la xanthine par la xanthine oxydase (selon Bergmeyer *et al.*, 1974). L'échantillon (2 mg/mL) a été introduit dans du DPBS (volume final 1,5 mL) contenu dans une cuve en quartz maintenue à 30°C sous agitation lente en présence de xanthine (100 µM). L'apparition d'acide urique a été mesurée par spectrophotométrie (290 nm) en calculant la pente de la courbe obtenue. Un blanc a été réalisé dans les mêmes conditions mais en absence d'échantillon.

## 6 Analyse statistique

Les résultats sont représentés comme la moyenne  $\pm$  sem. L'analyse statistique des données a été réalisée en utilisant un test t de student pour les comparaisons de deux groupes. Pour les comparaisons multi-groupes, une analyse de variance ANOVA à 2 facteurs puis un test de Scheffe ont été utilisés. Les statistiques pour la survie des animaux a été réalisées au moyen du test du Log-rank.

## **PARTIE III : RESULTATS**

## **Résultat 1 : La protéine H11 kinase/Hsp22 stimule la phosphorylation oxydative et module la production d'ERO mitochondriaux via des mécanismes dépendants du NO.**

Ce travail, qui a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr Depre (New Jersey Medical School, Newark, Etats-Unis), a été publié dans le journal Free Radical Biology and Medicine en 2012 sous la référence :

Laure L\*, Long R\*, Lizano P, Zini R, Berdeaux A, Depre C, Morin D. Cardiac H11 kinase/Hsp22 stimulates oxidative phosphorylation and modulates mitochondrial reactive oxygen species production: Involvement of a nitric oxide-dependent mechanism. Free Radic Biol Med. 2012 Jun 1-15; 52(11-12):2168-76.

### **1 Objectif de l'étude**

La sur-expression de la protéine Hsp22 induit un puissant effet cardioprotecteur similaire à celui obtenu après pré-conditionnement ischémique. Cette protection par Hsp22 est liée, du moins en partie, à une augmentation de l'expression de iNOS, qui est également le médiateur du pré-conditionnement tardif. Or l'une des cibles principales de l'effet cardioprotecteur du NO est la mitochondrie où le NO induit une adaptation de la fonction respiratoire mitochondriale en réduisant la consommation d'O<sub>2</sub> et la production d'ERO à l'ischémie ce qui diminuerait la probabilité d'ouverture du mPTP.

L'objectif de cette étude a donc été d'étudier si des modifications de la fonction mitochondriale induite par le NO pouvaient participer à l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22.

### **2 Protocoles expérimentaux**

Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle murin transgénique sur-exprimant la protéine Hsp22 (TG) spécifiquement dans le myocarde ainsi que leurs congénères de type sauvages (WT). Les mitochondries issues du ventricule gauche de ces animaux ont été isolées puis utilisées pour étudier différents paramètres :

- la consommation d'oxygène en présence de différents types de substrats à l'aide d'une électrode de Clark ;
- l'expression protéique des complexes de la chaîne respiratoire par western blot ou RT-PCR ainsi que leur activité par spectrophotométrie ;
- la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans différentes conditions de substrats et en présence d'un ou plusieurs inhibiteurs de certains complexes de la chaîne respiratoire par spectrofluorimétrie ;
- l'expression des NOS au niveau mitochondrial par western blot ainsi que la production de NO par les mitochondries isolées par spectrofluorimétrie ;
- l'ouverture du mPTP en analysant le gonflement de la mitochondrie induit par le calcium par spectrophotométrie.

Afin d'étudier les effets dépendants du NO ces expériences ont également été réalisées sur des mitochondries extraites à partir de myocardes d'animaux traités par un inhibiteur des NOS, le L-NAME (20 mg/kg/jour pendant 3 jours). Un capteur de NO, le 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO), a également été utilisé directement sur les mitochondries isolées.

Nous avons également réalisé la mesure de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que la mesure de la consommation d'O<sub>2</sub> après un épisode d'anoxie, lors de la réoxygénation, réalisé sur mitochondries isolées.

### **3 Résultats**

#### **3.1 La protéine Hsp22 active la chaîne respiratoire mitochondriale**

L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale est augmentée chez les souris TG que ce soit en stade 3 et en stade 4 ou après découplage et quel que soit le substrat utilisé (glucidique ou lipidique). Cette augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale s'accompagne d'une augmentation de l'expression des différents complexes qui la composent sans que la biogenèse mitochondriale ou que la quantité de mitochondries soient différentes chez les souris TG.

#### **3.2 La protéine Hsp22 module la production d'ERO mitochondriale**

Nos résultats ont montré que lors de l'utilisation de substrats fournissant du NADH au complexe I, les mitochondries issues d'animaux TG produisent plus d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ce qui pourrait être corrélé à l'augmentation d'activité de la chaîne respiratoire. En revanche, la production



d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par le retour des électrons du complexe II vers le complexe I étudiée en présence d'un substrat du complexe II est inhibée chez les souris TG. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a également permis de montrer que la capacité maximale des complexes I et III à produire de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était plus faible chez ces animaux.

### 3.3 Hsp22 augmente la production de NO mitochondriale

Les mitochondries isolées extraites des myocardes de souris TG produisent du NO en plus grande quantité et plus rapidement que celles de souris WT. Ceci est associé à une augmentation de l'expression protéique d'une NOS mitochondriale chez les souris TG (détectée à l'aide d'anticorps anti iNOS ou nNOS). Le prétraitement des animaux par le L-NAME permet d'abolir l'augmentation de production constatée chez les souris TG.

### 3.4 Hsp22 limite l'ouverture du mPTP

Le gonflement mitochondrial induit par le calcium est inhibé chez les souris TG quelle que soit la concentration de calcium utilisée. Ceci indique que la protéine Hsp22 limite l'ouverture du mPTP dans ces conditions.

### 3.5 Hsp22 régule la respiration mitochondriale par un mécanisme NO-dépendant

La stimulation de la respiration mitochondriale chez les souris TG est abolie que ce soit lorsque les animaux sont au préalable traités par le L-NAME ou lorsque du PTIO est ajouté *in vitro* dans le milieu d'incubation des mitochondries ce qui indique que le NO est responsable de cet effet stimulateur.

La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par le retour des électrons du complexe II vers le complexe I est rétablie chez les souris TG après traitement par le L-NAME ce qui suggère que le NO a un effet inhibiteur sur ce phénomène. Cette découverte a été confirmée par l'utilisation d'un donneur de NO sur des mitochondries issues de souris WT qui a permis de montrer que ce retour des électrons était inhibé de façon concentration-dépendante par le NO.

### 3.6 Effet de l'anoxie sur la chaîne respiratoire mitochondriale

Après anoxie, l'activité de la chaîne respiratoire (stade 3) est diminuée chez les souris WT et les souris TG lorsque la respiration est stimulée mais cet effet est exacerbé chez les souris TG. Le L-NAME reverse partiellement cet effet chez les souris TG mais n'a pas d'effet chez les souris WT.

L'anoxie induit également une augmentation de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  mitochondriale lors de l'utilisation de substrats du complexe I ou du complexe II mais cet effet est réduit chez les souris TG par rapport aux souris WT.

#### **4 Conclusion**

A l'état basal, la sur-expression de la protéine Hsp22 augmente la capacité des mitochondries à produire du NO, ce qui stimule la phosphorylation oxydative et inhibe le retour des électrons du complexe II vers le complexe I. Cette sur-expression réduit également la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par les complexes I et III lorsqu'ils sont fortement stimulés. Après anoxie, la sur-expression de la protéine Hsp22 exacerbe la diminution de phosphorylation oxydative par un mécanisme dépendant du NO et elle réduit l'augmentation de production d'ERO par la chaîne respiratoire. Ces caractéristiques sont semblables à celles conférées par le pré-conditionnement ischémique. La protéine Hsp22 induit donc au niveau mitochondrial des modifications qui pourraient participer à son effet cardioprotecteur.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/freeradbiomed](http://www.elsevier.com/locate/freeradbiomed)

## Original Contribution

# Cardiac H11 kinase/Hsp22 stimulates oxidative phosphorylation and modulates mitochondrial reactive oxygen species production: Involvement of a nitric oxide-dependent mechanism

Lydie Laure<sup>a,1</sup>, Romain Long<sup>a,1</sup>, Paulo Lizano<sup>b</sup>, Roland Zini<sup>a</sup>, Alain Berdeaux<sup>a</sup>,  
Christophe Depre<sup>b</sup>, Didier Morin<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U955, Equipe 03, Université Paris-Est, Faculté de Médecine, F-94010 Créteil, France

<sup>b</sup> Cardiovascular Research Institute, Department of Cell Biology and Molecular Medicine, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ 07107, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 November 2011

Received in revised form

23 February 2012

Accepted 9 March 2012

Available online 18 April 2012

## Keywords:

H11 kinase

Heart

Heat shock protein

Mitochondria

Nitric oxide

Oxidative phosphorylation

Reactive oxygen species

Free radicals

## ABSTRACT

H11 kinase/Hsp22 (Hsp22), a small heat shock protein upregulated by ischemia/reperfusion, provides cardioprotection equal to ischemic preconditioning (IPC) through a nitric oxide (NO)-dependent mechanism. A main target of NO-mediated preconditioning is the mitochondria, where NO reduces O<sub>2</sub> consumption and reactive oxygen species (ROS) production during ischemia. Therefore, we tested the hypothesis that Hsp22 overexpression modulates mitochondrial function through an NO-sensitive mechanism. In cardiac mitochondria isolated from transgenic (TG) mice with cardiac-specific overexpression of Hsp22, mitochondrial basal, ADP-dependent, and uncoupled O<sub>2</sub> consumption was increased in the presence of either glucidic or lipidic substrates. This was associated with a decrease in the maximal capabilities of complexes I and III to generate superoxide anion in combination with an inhibition of superoxide anion production by the reverse electron flow. NO synthase expression and NO production were increased in mitochondria from TG mice. Hsp22-induced increase in O<sub>2</sub> consumption was abolished either by pretreatment of TG mice with the NO synthase inhibitor L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME) or in isolated mitochondria by the NO scavenger phenyltetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide. L-NAME pretreatment also restored the reverse electron flow. After anoxia, mitochondria from TG mice showed a reduction in both oxidative phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, an effect partially reversed by L-NAME. Taken together, these results demonstrate that Hsp22 overexpression increases the capacity of mitochondria to produce NO, which stimulates oxidative phosphorylation in normoxia and decreases oxidative phosphorylation and reactive oxygen species production after anoxia. Such characteristics replicate those conferred by IPC, thereby placing Hsp22 as a potential tool for prophylactic protection of mitochondrial function during ischemia.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Heat shock protein 22 (Hsp22)<sup>2</sup> is a small-molecular-weight heat shock protein preferentially expressed in the heart [1,2]. Hsp22 transcript and protein expression is upregulated in various

models of ischemia, both in swine and in human patients [3,4]. These data support the hypothesis that Hsp22 may promote cell survival in a context of acute, repetitive, and chronic ischemia.

A transgenic (TG) mouse with cardiac-specific overexpression of Hsp22 was generated to reproduce the increased expression found in patients [5]. The molecular characteristics of the TG mouse reproduce many hallmarks of IPC, including activation of cell survival pathways, upregulation of heat shock proteins, inhibition of proapoptotic proteins, metabolic adaptation, and stimulation of growth pathways [6–10]. In particular, overexpression of Hsp22 is accompanied by an increased expression of the inducible isoform of nitric oxide (NO) synthase (iNOS) [6], the mediator of the delayed window of IPC [11], and preemptive conditioning of the swine heart by Hsp22 provides cardiac protection through iNOS [12]. A crucial

**Abbreviations:** FCCP, carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone; Hsp22, heat shock protein 22; IPC, ischemic preconditioning; L-NAME, L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester; MRC, mitochondrial respiratory chain; NOS, nitric oxide synthase; iNOS, inducible isoform of NOS; nNOS, neuronal NOS; PTIO, phenyltetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide; ROS, reactive oxygen species; TG, transgenic; WT, wild type

\* Correspondence to: Faculté de Médecine de Créteil, INSERM U955-équipe 03, 8 rue du Général, Sarrail, 94010 Créteil Cedex, France. Fax: +33 1 48 98 17 77.

E-mail address: [didier.morin@inserm.fr](mailto:didier.morin@inserm.fr) (D. Morin).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

and emerging aspect of the mechanisms of cardioprotection by IPC relies on an NO-mediated adaptation in mitochondrial respiratory function. It was proposed that NO could interact with components of the electron transport chain, reducing the generation of reactive oxygen species (ROS), and thereby decreasing the probability for mitochondrial permeability transition pore opening, a major promoter of cell death due to mitochondrial damage [13,14].

Therefore, in this study we used the TG mouse mentioned above to explore the hypothesis that an NO-dependent adaptation of mitochondrial function, more particularly oxidative phosphorylation and ROS production, could participate in the cardioprotective effect conferred by Hsp22 overexpression.

## Material and methods

### Animal model

We used TG female mice (3–4 months of age), expressing the coding sequence of human Hsp22 and a C-terminal hemagglutinin tag, and their wild-type (WT) littermates [7]. When indicated, mice were treated with the NO synthase inhibitor L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME; 20 mg/kg, ip) administered daily for 3 days before investigation. All animal procedures used in this study were in strict accordance with the European Community Council Directive 86-609/87-848 EEC and recommendations of the French Ministère de l'Agriculture.

### Isolation of fresh cardiac mitochondria

Left-ventricular tissue was homogenized in a buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Hepes, 2 mM EGTA, pH 7.4 at 4 °C) supplemented with 0.25% bovine serum albumin, using a Potter–Elvehjem glass homogenizer in a final volume of 10 ml. The homogenate was filtered through cheese cloth and centrifuged at 1000g for 5 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The mitochondrial pellet was resuspended in 50 µl of homogenization buffer without EGTA and bovine serum albumin.

For Western blot experiments and determination of mitochondrial NO production, mitochondria were purified on a Percoll gradient [15] as follows. Briefly, the left-ventricle cardiac muscle was added to 5 ml of homogenization buffer (sucrose 300 mM, Hepes 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7.4 at 4 °C) supplemented with 0.25% bovine serum albumin and including protease, kinase, and phosphatase inhibitors. The tissue was sliced and homogenized with a Potter–Elvehjem glass homogenizer by a motor-driven Teflon pestle at 1500 rpm in a final volume of 10 ml. The homogenate was centrifuged at 1100g for 5 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. Mitochondrial pellet was added to 500 µl of homogenization buffer supplemented with 20% Percoll. Homogenate was centrifuged at 15,000g for 10 min at 4 °C in a final volume of 10 ml. Supernatant was carefully removed and the pellet added to 10 ml of homogenization buffer (without Percoll) before centrifugation at 12,000g for 5 min at 4 °C. The final mitochondrial pellet was added to 50 µl of homogenization buffer to obtain a protein concentration of about 20 mg/ml, which was determined using the advanced protein assay reagent kit (Fluka).

### Mitochondrial oxygen consumption

Oxygen consumption of isolated mitochondria was measured at 30 °C with a Clark-type electrode fitted to a water-jacketed reaction chamber (Hansatech, Cergy, France). Mitochondria (0.2 mg protein) were incubated in a respiration buffer containing 100 mM KCl,

50 mM sucrose, 10 mM Hepes, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, at 30 °C. The following parameters of mitochondrial respiration were evaluated: (1) substrate-dependent respiration rate (State 4)—oxygen consumption in the presence of pyruvate/malate (5/5 mM), succinate (5 mM) plus rotenone (2 µM), or palmitoyl carnitine/malate (5 µM/2 mM); (2) ADP-stimulated respiration rate (State 3)—oxygen consumption in the presence of 250 µM ADP; uncoupling respiration in the presence of 0.2 µM carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP).

### Measurement of mitochondrial respiratory complex activity

Mitochondrial respiratory chain enzymatic activities were measured as before [16,17]. Briefly, mitochondrial complex I activity (NADH decylubiquinone oxidoreductase) was measured at 30 °C by monitoring the decrease in absorbance resulting from the oxidation of NADH at 340 nm. The incubation medium contained 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM decylubiquinone, 250 µM KCN, 1 mg/ml bovine serum albumin, and 0.1 mg/ml freeze-thawed heart mitochondria. The reaction was started by the addition of 200 µM NADH. Mitochondrial complex II activity (succinate ubiquinone reductase) was measured by monitoring the absorbance changes of 2,6-dichloroindophenol at 600 nm. The assay mixture contained 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 µM rotenone, 6 mM succinate, 250 µM KCN, 1 mg/ml bovine serum albumin, and 0.033 mg/ml freeze-thawed heart mitochondria. After a preincubation period of 5 min, the activity of the complex was measured in the presence of 80 µM 2,6-dichloroindophenol. Ubiquinol cytochrome c reductase activity (complex III) was measured as the rate of cytochrome c reduction at 550 nm. The reaction mixture contained 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 2 µM rotenone, 250 µM KCN, 1 mg/ml bovine serum albumin, 40 µM oxidized cytochrome c, 0.017 mg/ml freeze-thawed heart mitochondria. The reaction was started by the addition of 100 µM decylubiquinol. Mitochondrial complex IV activity (cytochrome c oxidase) was performed at 550 nm following the decrease in absorbance resulting from the oxidation of reduced cytochrome c.

### Determination of mitochondrial reactive oxygen species production

ROS generation was assessed by measuring the rate of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production. This was determined fluorometrically by the oxidation of Amplex red to fluorescent resorufin, coupled to the enzymatic reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by horseradish peroxidase. Essentially, superoxide anion generated in mitochondria was converted endogenously to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then measured by the assay. Briefly, Amplex red (10 µM) and horseradish peroxidase (1 U/ml) were added to isolated mitochondria (0.2 mg protein) in the respiration buffer maintained at 30 °C. The reaction was initiated by addition of the respiratory substrates (pyruvate/malate or succinate, 5 mM). The subsequent increase in fluorescence was monitored over time using a fluorescence spectrometer (PerkinElmer SA LS 50B, excitation wavelength 563 nm; emission wavelength 587 nm). Known amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were used to generate standard curves to calculate the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in nmol/min/mg of mitochondrial protein.

### Evaluation of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening

mPTP opening was studied by analyzing mitochondrial swelling assessed by measuring the change in absorbance at 540 nm (A<sub>540</sub>) using a Jasco V-530 spectrophotometer. Experiments were carried out at 30 °C in 1 ml of respiration buffer with addition of

pyruvate/malate (5/5 mM). Mitochondria (0.4 mg/ml) were incubated for 1 min in the respiration buffer and swelling was induced by the addition of increasing concentrations of calcium.

#### Determination of mitochondrial nitric oxide production

NO production of isolated myocardial mitochondria was determined as previously described [18]. Briefly, mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated in the respiration buffer including calcium (50  $\mu$ M), (Diaminofluorescein-FM.diacetate DAF-FM) (50  $\mu$ M), superoxide dismutase (250 U/ml), and catalase (350 U/ml) to prevent interference of superoxide anion and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. NO production was monitored at 30 °C using a temperature-controlled spectrofluorometer (Jasco FP-6300; excitation wavelength 495 nm; emission wavelength 415 nm). DAF specificity to NO was tested by adding increasing concentration of the NO donor diethylamine NONOate (releasing 1.5 mol of NO by mole of NONOate) which induced a rapid and proportional increase in the probe fluorescence. Known amounts of NONOate were used to generate standard curves to calculate the rate of NO production in nmol/min/mg of mitochondrial protein.

#### In vitro anoxia/reoxygenation

Isolated mitochondria (0.2 mg protein) were placed in the water-jacketed reaction chamber containing N<sub>2</sub>-saturated respiration buffer and were maintained at 30 °C for 5 min with a constant steam of N<sub>2</sub> above the solution. Reoxygenation was induced by the addition of the respiration oxygenated buffer and mitochondria were incubated for 1 min before measuring oxidative phosphorylation and ROS production.

#### Measurement of mitochondrial citrate synthase activity

Citrate synthase activity was determined at 412 nm by measuring the initial rate of reaction of liberated coenzyme A-SH with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Mitochondria (0.05 mg/ml) were incubated in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5 at 37 °C) supplemented with 0.2% Triton X-100 and containing 0.2 mM acetyl-CoA and 0.1 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid in a final volume of 1 ml. The reaction was carried out at 37 °C and initiated by the addition of 0.5 mM oxaloacetate. Measurements were made in a Jasco V-530 spectrophotometer.

#### Western blot analysis

Proteins were denatured by boiling, resolved on SDS-PAGE 10% polyacrylamide gels, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in a Tris buffer (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) containing 0.05%

Tween 20 for 1 h at room temperature. Subsequently, membranes were exposed for 2 h to goat polyclonal anti-human Hsp22 antibody (1:500; Abcam), anti-rat/mouse total OxPhos Complex antibody (1:2500; Invitrogen, Cergy Pontoise, France), rabbit polyclonal anti-voltage-dependent anion channel antibody (1:1000; Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-iNOS (1:1000; Cell Signaling), rabbit polyclonal anti-neuronal NOS (1:1000; Cell Signaling), or rabbit polyclonal anti-peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) antibody (1:1000; Abcam). After incubation with goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology), donkey anti-goat (Santa Cruz Biotechnology), or goat anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology) as a secondary antibody at 1:5000, blots were revealed by enhanced chemiluminescent reaction (Amersham ECL) and exposed to X-ray films (Amersham Biosciences). Bands were analyzed by densitometry using ImageJ software.

#### Quantitative RT-PCR

Hearts were sampled from TG and WT mice. Total RNA was isolated from mouse heart using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using the SuperScript first-strand synthesis system for the RT-PCR kit (Invitrogen) and random oligonucleotides. Expression of genes encoding NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate dehydrogenase subunit A (complex II), ubiquinol cytochrome c reductase (complex III), cytochrome c oxidase polypeptide IV subunit 1 (complex IV), and ATP synthase subunit  $\alpha$  (complex V) was monitored by a real-time qRT-PCR method using an Applied Biosystems 7000 real-time PCR system. The ubiquitous 18S RNA was used to normalize the data across samples. Its expression was monitored by SYBRGreen incorporation. The primer pairs used for amplification are given in Table 1. Each experiment was performed in duplicate and repeated at least twice.

#### Statistical analysis

Results are presented as the mean  $\pm$  SEM for the number of samples indicated in the legends. Statistical comparison was performed using the Student *t* test, with statistical significance set at *P* < 0.05. Two-way analysis of variance with the post hoc Bonferroni correction was used for multigroup comparison.

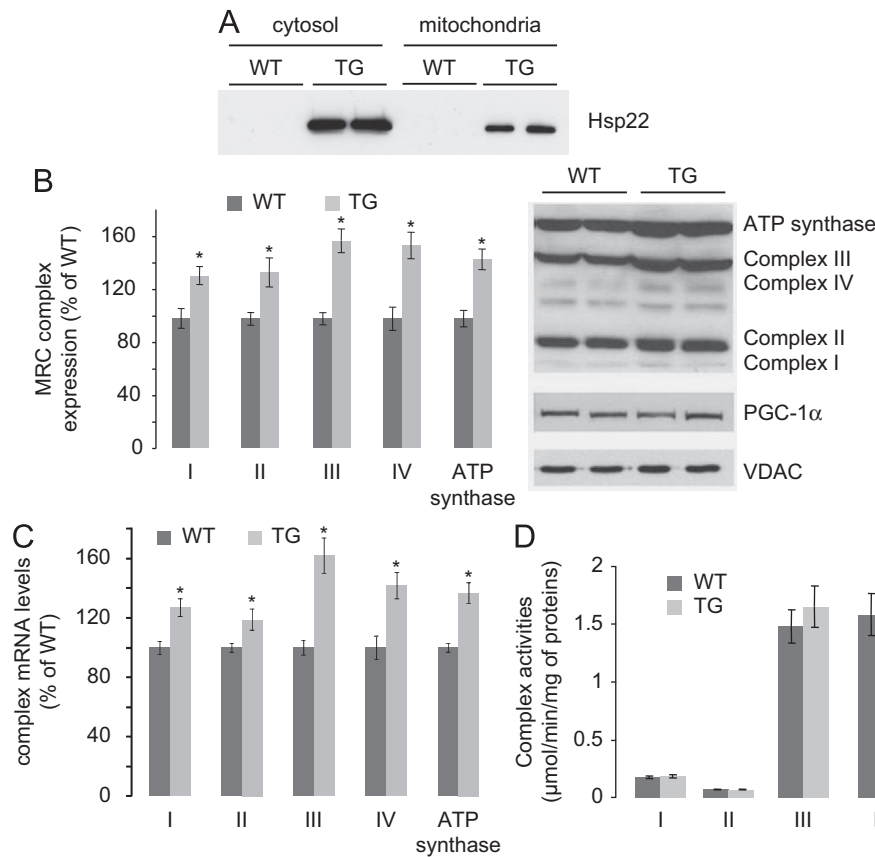
## Results

#### Characteristics of the mice

The functional and morphological characteristics of TG mice have been detailed before [5,6,10]. As expected from these previous

**Table 1**  
Primers used for qRT-PCR.

Gene	Primer name	Sequence (5' → 3')
NADH ubiquinone oxidoreductase	NDUFS7 F	CCCTGTGGCCTATGACCTT
	NDUFS7 R	AGCGTGCCAGCTACAATCAT
Succinate dehydrogenase subunit A	SDHA F	CTTGAATGAGGCTGACTGTG
	SDHA R	ATCACATAAGCTGGTCCTGT
Ubiquinol cytochrome c reductase	UQCRC2 F	TTCCCTGCTCACTGGCTACT
	UQCRC2 R	TCATGCTCTGGTTCTGATGC
Cytochrome c oxidase polypeptide IV subunit 1	COXIV-I F	ACTACCCCTGCCTGATGTG
	COXIV-I R	GCCCCAAGTCTTCCATT
ATP synthase subunit $\alpha$	ATP5A1 F	CCTTCCACAAGGAACTCCAA
	ATP5A1 R	GGTAGCTGTTGGTGGGCTAA
18S	18S F	TCCACAGTAAGTCCGGGTCATA
	18S R	CGAGGGCCTCACTAAACCATC



**Fig. 1.** Protein expression and activities of mitochondrial respiratory chain complexes in TG mice: (A) Immunoblotting of Hsp22 in cytosolic and mitochondrial myocardial fractions in WT and TG mice. (B) Immunoblotting of complexes I–V and of PGC-1 $\alpha$  in mitochondrial fractions from TG and WT mice. Voltage-dependent anion channel (VDAC) was used as a loading control. Each value is expressed in percentage of WT value and represents the mean  $\pm$  SEM of six independent preparations. \* $P < 0.05$  vs. WT. (C) RNA expression of mitochondrial respiratory chain complexes in TG and WT mice. 18S was used to normalize the data across samples. Each value is expressed in percentage of WT value and represents the mean  $\pm$  SEM of four independent preparations. \* $P < 0.05$  vs. WT. (D) Enzymatic activity of each respiratory chain complex ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein) measured in mitochondrial fractions prepared from hearts of WT and TG mice. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of six independent preparations.

studies, cardiac hypertrophy was significant in TG mice, as characterized by the left-ventricular weight/tibial length ratio, which increased from  $3.94 \pm 0.07$  mg/mm in WT to  $5.66 \pm 0.09$  mg/mm in TG mice ( $P < 0.01$ ;  $n = 10$ ). In addition, Fig. 1A shows that Hsp22 is overexpressed in cytosolic and mitochondrial fractions of the myocardium of TG mice compared with WT.

#### Activation of the mitochondrial respiratory chain in TG mice

The activity of the mitochondrial respiratory chain (MRC) was evaluated in the presence of either glucidic (pyruvate/malate) or lipidic (palmitoyl carnitine) substrates of complex I. As shown in Table 2, TG mice exhibited a significant ( $P < 0.05$ ) increase in both States 4 and 3 values under these conditions. A significant increase in State 3 values was also observed when a substrate of complex II (succinate in the presence of rotenone) was used. Addition of the uncoupling agent FCCP further increased MRC activity in TG mice (Table 2) whatever the substrate used. Because these results showed that Hsp22 overexpression increased the activity of MRC, we evaluated the expression of MRC complexes in TG mice by Western blot analysis and qRT-PCR. Immunoblotting showed that MRC complexes were significantly upregulated compared with WT mice by  $\approx 133\%$ ,  $135\%$ ,  $160\%$ , and  $157\%$  for complexes I, II, III, and IV, respectively (Fig. 1B). Similar results were obtained with mRNA level determination (Fig. 1C).

These effects were not related to a difference in mitochondrial concentration between groups, as citrate synthase activity was

**Table 2**

Characterization of mitochondrial respiratory chain activity in TG mice.

		O <sub>2</sub> consumption (nmol/min/mg protein)		
		P/M	Suc+Rot	PC
WT	State 4	76 $\pm$ 5	142 $\pm$ 10	84 $\pm$ 8
WT	State 3	319 $\pm$ 11	347 $\pm$ 21	336 $\pm$ 27
WT	Uncoupled	322 $\pm$ 15	–	354 $\pm$ 11
TG	State 4	102 $\pm$ 5*	149 $\pm$ 9	109 $\pm$ 8*
TG	State 3	392 $\pm$ 18*	407 $\pm$ 5*	467 $\pm$ 46*
TG	Uncoupled	408 $\pm$ 12*	–	483 $\pm$ 51*

Substrate-dependent (State 4), ADP-stimulated (State 3), and uncoupled (with FCCP) O<sub>2</sub> consumption was measured in the presence of glucidic (pyruvate/malate (P/M) or succinate+rotenone (Suc+Rot)) or lipidic (palmitoyl carnitine (PC)) substrates as described under Material and methods. Each value is the mean  $\pm$  SEM of at least six independent mitochondrial preparations.

\*  $P < 0.05$  vs. respective WT.

identical between WT and TG mice ( $257 \pm 24$  vs.  $243 \pm 21$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteins,  $n = 10$ , respectively). This was confirmed by measurement of the abundance of PGC-1 $\alpha$ , an important regulator of mitochondrial biogenesis, which was similar in WT and TG mice (Fig. 1B). In addition, stimulation of MRC activity in TG mice cannot be ascribed to an increase in activity of mitochondrial complexes because no difference was found between WT and TG mice when we measured the activity of each MRC complex separately (Fig. 1D).



### Modulation of reactive oxygen species production by Hsp22 overexpression

We studied next the consequences of the increase in MRC activity in TG mice on ROS production. When pyruvate/malate was used as substrates, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was low but significantly increased in TG mice compared with WT (Fig. 2). The presence of rotenone, a specific inhibitor of complex I acting at the ubiquinone reducing site [19], increased superoxide production in mitochondria from WT and TG mice. This could be due to the rotenone site itself or to an upstream site of the complex such as the flavin or the iron–sulfur cluster sites, which are involved in electron transfer [20]. In addition, rotenone abolished the increase in superoxide production observed between WT and TG mice (Fig. 2). This result indicates that the higher production of superoxide in mitochondria from TG mice was caused by the rotenone site itself or was located downstream within the MRC and thus abrogated a potential role of upstream sites. Moreover, rotenone-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was reduced in mitochondria from TG mice compared with WT, showing that the ability of complex I to generate superoxide in TG mice was restricted when the forward electron transport was blocked. Therefore we analyzed the production of superoxide caused by complex III, the other site of production within the MRC. We used oxidation of succinate in the presence of rotenone to generate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only from complex III. Under these conditions, the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was similar in WT and TG mice (Fig. 2), which is in agreement with the fact that State 4 respiration rates observed in these mice were similar when MRC was stimulated by succinate in the presence of rotenone (Table 2). This suggests that complex III could not be the site for the overproduction of superoxide in mitochondria from TG mice fed with pyruvate/malate. This hypothesis was reinforced by the investigation of the capacity of complex III from TG mice to produce superoxide. This was performed by measuring superoxide production in the presence of antimycin A, an inhibitor of complex III that induces a high superoxide production from the Q<sub>0</sub> center of complex III [21]. Antimycin A-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was strongly decreased in mitochondria from TG mice compared with WT (Fig. 2), indicating that the capacity of complex III to generate superoxide is limited in TG mice when the production is highly stimulated.

As shown in Fig. 2, when succinate was used as a substrate instead of pyruvate/malate, the production rate of mitochondrial superoxide was higher in WT than in TG mice. This high rate was abolished by rotenone showing that superoxide production is due

to complex I and is caused by the reverse electron transfer from complexes II to I as previously shown [22]. Interestingly, the reverse electron transfer was hugely inhibited in mitochondria from TG mice during succinate oxidation.

Taken together these data indicate that Hsp22 overexpression increases the net production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from mitochondria in the baseline state after the activation of MRC, but abolished superoxide production due to reverse electron flow, and decreased the capacity of complexes I and III to generate superoxide when their activity is maximized.

### Hsp22 overexpression stimulates mitochondrial NO production

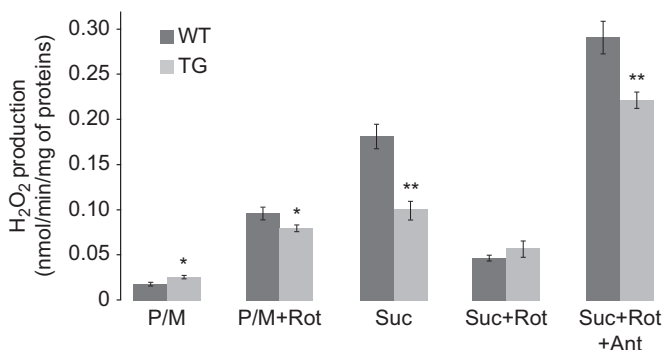
Because overexpression of Hsp22 is accompanied by an increased expression of iNOS [6], we analyzed the generation of NO from mitochondria of WT and TG mice. These experiments were performed on mitochondria purified on a Percoll gradient to avoid membrane contamination. Fig. 3A shows that myocardial mitochondria prepared from TG mice produced significantly more NO and at a faster rate than WT mice. This effect was inhibited when TG mice were pretreated with L-NAME. In agreement with these results, immunoblotting of mitochondrial proteins showed an increased expression of NOS in TG mice compared with WT, which was detectable using both iNOS- and nNOS-specific antibodies (Fig. 3B).

### Hsp22 overexpression limits mPTP opening

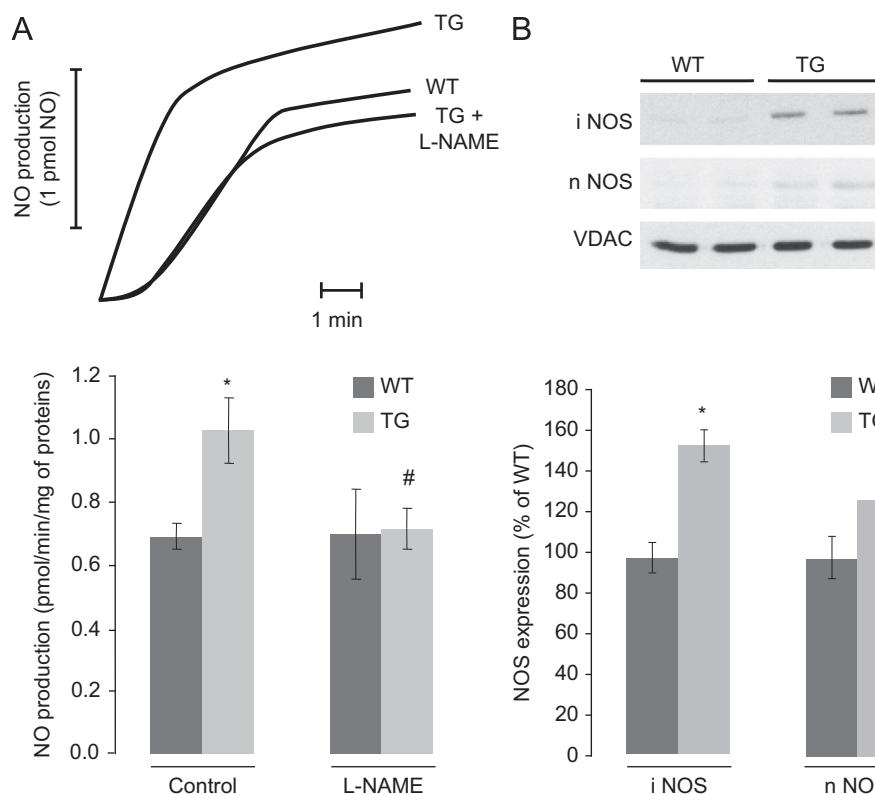
Given that mitochondrial NO production was reported to protect against mPTP opening, we examined mPTP opening in cardiac mitochondria isolated from WT and TG mice. Fig. 4 shows that calcium-induced mitochondrial swelling was decreased in TG mice and this was observed whatever the calcium concentration used. This indicates that Hsp22 overexpression limits mPTP opening.

### Regulation of mitochondrial respiration by Hsp22 is NO-dependent

We investigated next whether the changes in MRC activity found in TG mice are due to this difference in NO production. For that purpose, mice were treated with the NOS inhibitor L-NAME daily for 3 days before preparation of the mitochondria and measurement of mitochondrial respiration in both States 3 and 4. L-NAME totally abolished the difference in MRC activity observed between mitochondria from TG and WT mice for both States 3 and 4 using pyruvate/malate as substrates (Fig. 5A). A similar result was observed when MRC activity of myocardial mitochondria from TG mice was measured in the presence of the NO scavenger 2-phenyltetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (PTIO) (Fig. 5C). However, L-NAME did not affect the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, either when the respiratory electron chain was fed by pyruvate/malate, when the forward electron transport was blocked by rotenone, or when the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was induced by complex III in the presence of antimycin A (Fig. 5B). Conversely, L-NAME suppressed the decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production observed in the presence of succinate in mitochondria from TG mice compared with WT, i.e., it restored the reverse electron transfer at the level of complex I (Fig. 5B). To further characterize the role of NO on reverse electron transport, we performed experiments analyzing the effect of the NO donor NONOate in mitochondria issued from WT mice at concentrations that did not affect respiration. As shown in Fig. 5D, the addition of increasing concentrations of NONOate decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production during succinate oxidation. This was not caused by a direct interaction of NO with superoxide, the precursor of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which could have affected H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, because even the highest concentration of NONOate used did not



**Fig. 2.** Modulation of reactive oxygen species production in TG mice. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was induced by pyruvate/malate (P/M, 5/5 mM) or succinate (Suc, 5 mM) in the absence or in the presence of either rotenone (Rot, 2 μM) or antimycin (Ant, 2 μM) and was determined fluorometrically by the oxidation of Amplex red to fluorescent resorufin. Each value represents the mean ± SEM of at least eight independent preparations. \**P* < 0.05 vs. WT; \*\**P* < 0.005 vs. WT.



**Fig. 3.** Stimulation of NO production in TG mice: (A) NO production by mitochondria was determined fluorometrically using DAF-FM (10  $\mu$ M) in the presence of SOD (250 U/ml) and catalase (350 U/ml). Curves are representative of four experiments. NO production was calculated by measuring the slope of the initial production of each curve. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of at least four independent preparations. \* $P < 0.05$  vs. WT; # $P < 0.05$  vs. TG control mice. (B) Expression of NOS in mitochondrial fractions from TG and WT mice. Voltage-dependent anion channel (VDAC) was used as a loading control. Each value is expressed in percentage of WT value and represents the mean  $\pm$  SEM of six independent preparations. \* $P < 0.05$  vs. WT.

modify  $H_2O_2$  production in the presence of pyruvate/malate as substrates (data not shown). This decrease in  $H_2O_2$  production during succinate oxidation was due to inhibition of the reverse electron flow, a similar effect being observed in the presence of rotenone. In addition, we confirmed that this inhibition was due to NO delivery because PTIO abolished the effect of NONOate. These results demonstrate that reverse electron transport can be inhibited by NO and that NO could be responsible for this inhibition in TG mice.

#### Mitochondrial respiratory chain under anoxic conditions

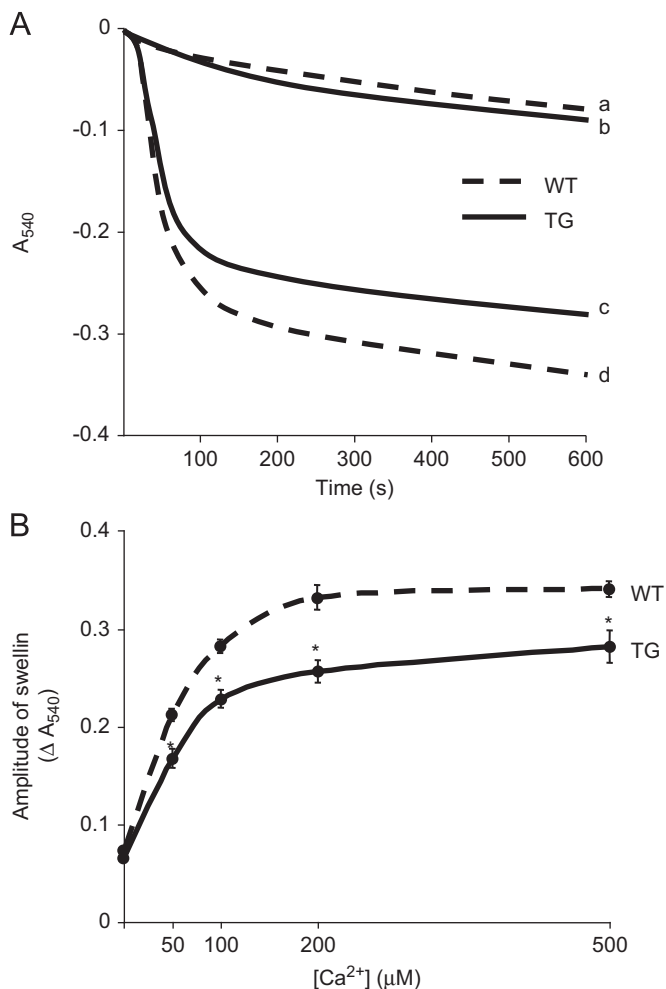
The results presented above imply a role for NO in the regulation of mitochondrial respiration by Hsp22. Because the role of NO predominates under ischemic conditions, when oxygen pressure is low [14], the measurement of respiration in isolated mitochondria was repeated after a period of anoxia in the presence of pyruvate/malate. After anoxia, mitochondria from TG mice showed a reduction in MRC activity that was significantly more important than that found in corresponding WT mice (Fig. 6) when respiration was fully stimulated (State 3 or uncoupled respiration). Anoxia induced an increase in  $H_2O_2$  production that was observed either with complex I or with complex II substrates but this effect was reduced in TG compared with WT mice (Fig. 7). L-NAME partially reversed the effects of anoxia in mitochondria from TG mice, whereas it had no effect in corresponding preparations issued from WT mice (Fig. 6). These results show that anoxia strongly reduces mitochondrial respiration through an NO-sensitive mechanism and this leads to an inhibition of postanoxia  $H_2O_2$  generation.

#### Discussion

This study demonstrates that Hsp22 overexpression modulates MRC in both normoxia and anoxia by an NO-dependent mechanism and that this effect could participate in the cardioprotection conferred by Hsp22 in TG mice. Growing evidence suggests that NO-mediated preconditioning is in large part related to a modulation of mitochondrial function. NO has been shown to inhibit cytochrome c oxidase and cytochrome c release, to increase mitochondrial biogenesis, and to limit ROS synthesis [23,24]. Most of these effects are reproduced by nitrite and by a mitochondria-targeted S-nitrosothiol and administration of these drugs reproduces the protection conferred by IPC by modulating mitochondrial respiration [25,26]. Remarkably, the TG mouse with overexpression of Hsp22 shows an increase in iNOS expression that is exactly in the same range as that observed during an episode of IPC [5]. The cytosolic location of iNOS makes it the isoform of choice to synthesize the NO that will target mitochondria but recent immunohistochemical and biochemical studies [27] show that mitochondria also possess their own NOS and are able to generate NO. This study confirms these data and demonstrates that mitochondrial NOS abundance was significantly increased in TG mice, indicating that both cytosolic and mitochondrial-derived NO can contribute to the effect of Hsp22 overexpression.

This might explain the ability of cardiac mitochondria of TG mice to resist mPTP opening because mitochondrial NO was reported to protect against mPTP [18]. However, as mitochondrial NOS was detected with both iNOS and nNOS antibodies, we cannot make a conclusion on the identity of this NOS. This is a limitation of the study. On the other hand, further investigations

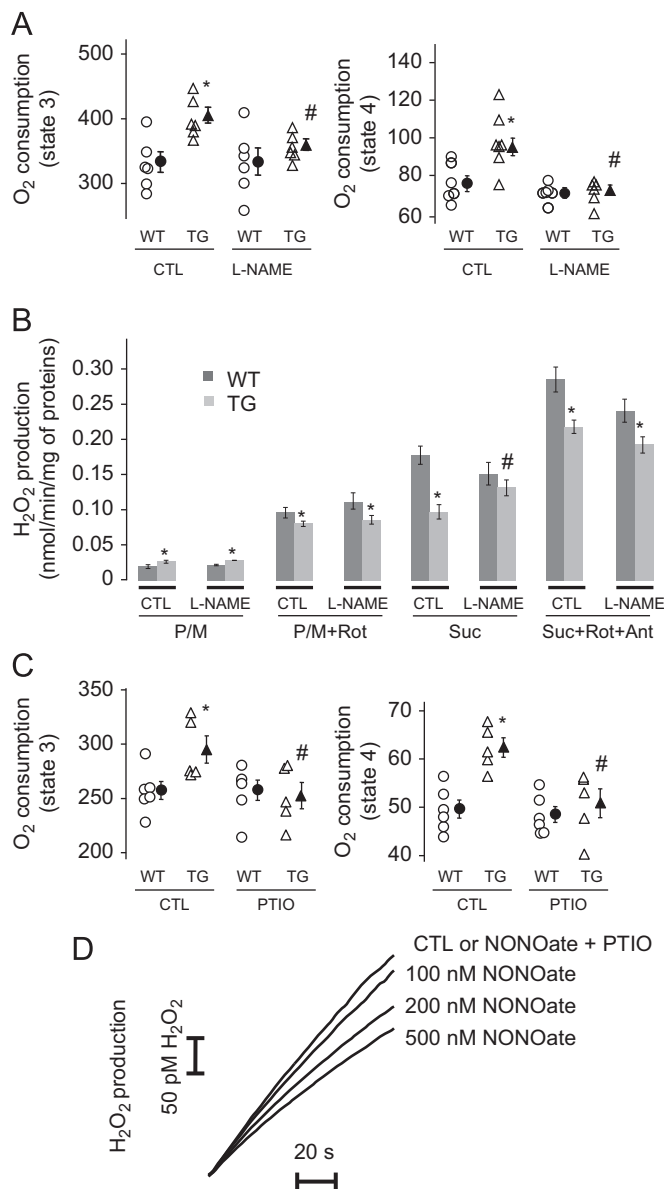




**Fig. 4.** Mitochondrial swelling in TG mice: (A) Mitochondria isolated from left ventricles of WT and TG mice were incubated in the respiration buffer and swelling was induced by the addition of 500 μM calcium (curves c and d). (curves a and b) No addition of calcium. (B) Evaluation of mitochondrial swelling in the presence of increasing concentrations of calcium. \**P* < 0.05 vs. WT.

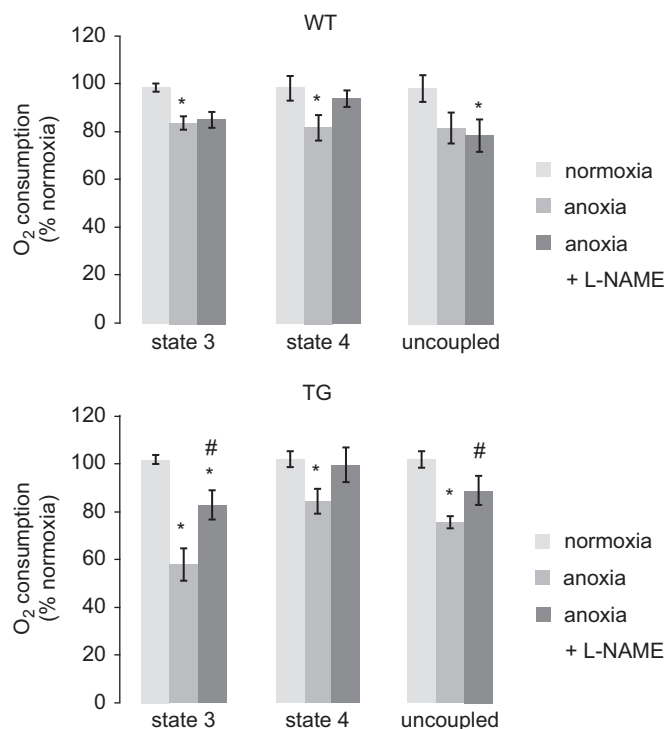
are needed to determine the mechanism by which mitochondrial NOS increases in TG mice.

Our data clearly show that Hsp22 overexpression caused an increase in oxidative phosphorylation when mitochondria are fed with NADH substrates in normoxia. This effect is related to the increased expression of NOS as it was blocked by L-NAME pretreatment of TG mice. An apparent paradox is evident with respect to the interaction of NO and its derivatives with MRC. Indeed, NO was shown to inhibit and not to stimulate mitochondrial respiration mainly through interaction with complex IV [28], indicating that the effect observed in TG mice might be unrelated to a direct interaction of NO at the level of the MRC. However, the increase in oxidative phosphorylation was also blocked by the addition of the NO scavenger PTIO, confirming that NO produced within the organelle is responsible for this effect. We were unable to reproduce this stimulating effect in mitochondria issued from WT mice by delivering increasing concentrations of NO by means of NONOate (not shown). This supports the idea that other factors than NO could be involved in this mechanism. We recently found that Hsp22 localizes inside the mitochondria where it coprecipitates with STAT3 [29], which has been recently reported to stimulate oxidative phosphorylation [30]. A likely hypothesis may be that NO needs such a complex to exert its effect.

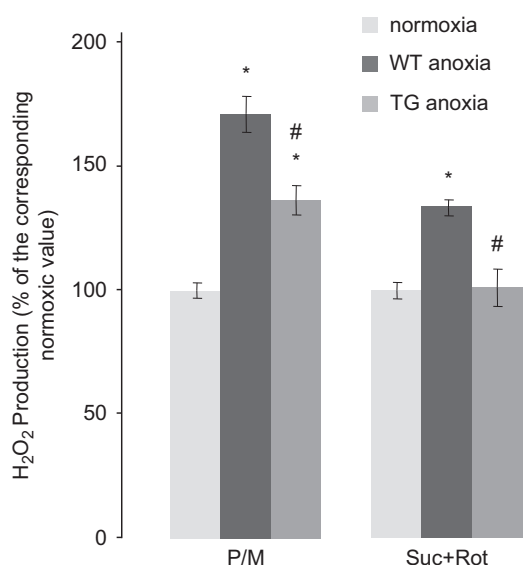


**Fig. 5.** NO-dependent regulation of the mitochondrial respiratory chain and of the mitochondrial production of reactive oxygen species in TG mice: (A,B) Fresh mitochondria were isolated from left ventricles of WT and TG mice pretreated or not with L-NAME (20 mg/kg/day for 3 days): (A) O<sub>2</sub> consumption (nmol O<sub>2</sub>/min/mg protein) was induced by pyruvate/malate (P/M, 5/5 mM) in the presence (State 3) or in the absence (State 4) of 0.25 mM ADP. Each value represents the mean ± SEM of six independent preparations. \**P* < 0.05 vs. WT, #*P* < 0.05 vs. untreated (control, CTL) mice. (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was induced by P/M (5/5 mM) or succinate (Suc, 5 mM) in the presence of 2 μM rotenone (Rot) and/or 2 μM antimycin (Ant) and was determined fluorometrically. Each value represents the mean ± SEM of at least eight independent preparations. \**P* < 0.05 vs. WT; #*P* < 0.05 vs. respective control (CTL) mice. (C) Fresh mitochondria were isolated from left ventricles of WT and TG mice and O<sub>2</sub> consumption (nmol O<sub>2</sub>/min/mg protein) was induced by P/M (5/5 mM, State 4) or by P/M (5/5 mM)+ADP (0.25 mM, State 3) in the absence or in the presence of PTIO (50 μM). Each value represents the mean ± SEM of five or six independent preparations. \**P* < 0.05 vs. WT, #*P* < 0.05 vs. respective CTL mitochondria. (D) Fresh mitochondria were isolated from left ventricles of WT mice and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was induced by succinate (5 mM) in the absence (CTL) or in the presence of increasing concentrations of NONOate in mitochondria issued from WT mice. PTIO (50 μM) abolished the effect of NONOate whatever the concentration used. Results are representative of four independent experiments.

The fact that Hsp22 overexpression is associated with an increase in all complexes of the MRC without change in their respective activity could also contribute to the stimulation of



**Fig. 6.** Mitochondrial respiratory chain after anoxia in TG mice. Fresh mitochondria were isolated from left ventricles of WT and TG mice pretreated or not with L-NAME (20 mg/kg/day for 3 days). O<sub>2</sub> consumption was measured in the presence of pyruvate/malate (5/5 mM) and in the absence (substrate-dependent State 4) or presence of ADP (ADP-stimulated State 3) or FCCP (uncoupled state). Experiments were performed under normoxic conditions or after 5 min anoxia. Each value represents the mean ± SEM of six independent preparations. \**P* < 0.05 vs. respective normoxia; #*P* < 0.05 vs. respective anoxia.



**Fig. 7.** Reactive oxygen species production after anoxia in TG mice. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was induced by pyruvate/malate (P/M) or succinate+rotenone (Suc+Rot) and was determined fluorometrically by oxidation of Amplex red to fluorescent resorufin. Each value represents the mean ± SEM of five independent preparations. \**P* < 0.05 vs. respective normoxia; #*P* < 0.05 vs. respective anoxia.

oxidative phosphorylation. It has been shown that NO stimulates mitochondrial biogenesis [31,32] through activation of the transcription factor PGC-1 $\alpha$  resulting in an increase in MRC complexes [33]. Given that Hsp22 overexpression modifies neither the

quantity of cardiac mitochondria nor the expression of the transcription factor PGC-1 $\alpha$ , a role for mitochondrial biogenesis is unlikely. It is therefore possible that such enrichment in mitochondrial complexes found in TG mice may be mediated by NO but independent of mitochondrial biogenesis. Hsp22 overexpression may activate nuclear receptors and transcription factors leading to increased expression of mitochondrial respiratory complexes although we have no data to support such hypothesis at the present time.

Our study also shows that Hsp22 overexpression stimulates mitochondrial ROS generation produced by NADH substrates in normoxia but lessens this ROS production from complexes I and III when they are blocked, i.e., in the presence of rotenone and antimycin. This suggests that the maximal capacity of both complexes to generate ROS is decreased in TG mice. This property is observed both in normoxia and after anoxia and is maintained when TG mice are treated with L-NAME, excluding a role for NO. This would be consistent with structural modifications of the complexes, which would not alter electron transport under native conditions.

In the same way, Hsp22 overexpression largely attenuates the high rate of superoxide production observed with the complex II substrate succinate. This production of superoxide is also inhibited by rotenone and is caused by the reverse electron flow through complex I under conditions of high proton-motive force [22]. Recent data demonstrate that this process can occur under physiological conditions [34,35] and that persistent reverse electron flow may be associated with aging [36,37]. It may also be a significant factor of ischemia/reperfusion injury because it is largely decreased after ischemia [38]. Reverse electron flow is highly dependent on a high membrane potential. As we did not observe any difference in mitochondrial membrane potential between WT and TG mice (not shown), this cannot explain the decrease in reverse electron flow observed in TG mice. Interestingly, reverse electron flow is restored after L-NAME treatment in TG mice, suggesting that NO may occupy a site that limits reverse electron flow in complex I of TG mice without affecting overall electron transport of complex I itself under basal conditions. A similar effect was observed with diphenyleioldonium, which also inhibited ROS production [39]. Consistent with such an effect of NO, we demonstrate that direct NO delivery to isolated mitochondria from WT mice inhibits reverse electron flow. This inhibiting effect of NO could contribute to the cardioprotective effect observed in TG mice as NO-mediated transient inhibition of complex I activity was involved in its cardioprotective effect [25]. The hypothesis for a protective role of NO in mitochondria from TG mice is also supported by their behavior under anoxic conditions. Indeed, anoxia strongly reduces mitochondrial respiration from TG mice, an effect that is sensitive to L-NAME treatment, and this leads to a strong inhibition of postanoxia ROS generation. It should be noted that this inhibition of mitochondrial functions in TG mice during anoxia is similar to that described for nitrite, which also exhibits cardioprotective properties [25], and that pharmacological inhibition of mitochondrial respiration during ischemia was shown to improve postischemic reperfusion injury [40,41]. Thus, mitochondria from TG mice seem naturally protected against ischemic stress and react like mitochondria from WT mice subjected to a protective pharmacological treatment.

In conclusion, this study demonstrates that Hsp22 overexpression (1) increases the capacity of mitochondria to produce NO, which stimulates MRC activity in normoxia, and (2) decreases the activity of MRC and its capacity to generate ROS after anoxia. Such characteristics replicate to a large extent those conferred by ischemic preconditioning, thereby positioning Hsp22 as a potential tool for prophylactic protection of mitochondrial function during ischemia.

## Acknowledgments

L. Laure was supported by a postdoctoral grant from INSERM/AREMCAR. R. Long was supported by a doctoral grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie.

## References

- [1] Kappe, G.; Verschuure, P.; Philipsen, R.; Staalduijn, A.; Van den Bogaart, P.; Boelens, W.; De Jong, W. Characterization of two novel human small heat shock proteins: protein kinase-related HspB8 and testis-specific HspB9. *Biochim Biophys Acta* **1520**:1–6; 2001.
- [2] Smith, C.; Yu, Y.; Kulka, M.; Aurelian, L. A novel human gene similar to the protein kinase (PK) coding domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) codes for a serine–threonine PK and is expressed in melanoma cells. *J Biol Chem* **275**:25690–25699; 2000.
- [3] Depre, C.; Tomlinson, J. E.; Kudej, R. K.; Gaussin, V.; Thompson, E.; Kim, S. J.; Vatner, D. E.; Topper, J. N.; Vatner, S. F. Gene program for cardiac cell survival induced by transient ischemia in conscious pig. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:9336–9341; 2001.
- [4] Depre, C.; Kim, S. J.; John, A. S.; Huang, Y.; Rimoldi, O. E.; Pepper, J. R.; Dreyfus, G. D.; Gaussin, V.; Pennell, D. J.; Vatner, D. E.; Camici, P. G.; Vatner, S. F. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium. *Circ Res* **95**:433–440; 2004.
- [5] Depre, C.; Hase, M.; Gaussin, V.; Zajac, A.; Wang, L.; Hittinger, L.; Ghaleh, B.; Yu, X.; Kudej, R. K.; Wagner, T.; Sadoshima, J.; Vatner, S. F. H11 kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* **91**:1007–1014; 2002.
- [6] Depre, C.; Wang, L.; Sui, X.; Qiu, H.; Hong, C.; Hedhli, N.; Ginion, A.; Shah, A.; Pelat, M.; Bertrand, L.; Wagner, T.; Gaussin, V.; Vatner, S. F. H11 kinase prevents myocardial infarction by pre-emptive preconditioning of the heart. *Circ Res* **98**:280–288; 2006.
- [7] Danan, I. J.; Rashed, E. R.; Depre, C. Therapeutic potential of H11 kinase for the ischemic heart. *Cardiovasc Drug Rev* **25**:14–29; 2007.
- [8] Sui, X.; Li, D.; Qiu, H.; Gaussin, V.; Depre, C. Activation of the bone morphogenetic protein receptor by H11 kinase/Hsp22 promotes cardiac cell growth and survival. *Circ Res* **104**:887–895; 2009.
- [9] Wang, L.; Zajac, A.; Hedhli, N.; Depre, C. Increased expression of H11 kinase stimulates glycogen synthesis in the heart. *Mol Cell Biochem* **265**:71–78; 2004.
- [10] Hedhli, N.; Wang, L.; Wang, Q.; Rashed, E.; Tian, Y.; Sui, X.; Madura, K.; Depre, C. Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 kinase/Hsp22. *Cardiovasc Res* **77**:497–505; 2008.
- [11] Bolli, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol* **33**:1897–1918; 2001.
- [12] Chen, L.; Lizano, P.; Zhao, X.; Sui, X.; Dhar, S. K.; Shen, Y. T.; Vatner, D. E.; Vatner, S. F.; Depre, C. Preemptive conditioning of the swine heart by H11 kinase/Hsp22 provides cardiac protection through inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**:H1303–1310; 2011.
- [13] Jones, S.; Bolli, R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* **40**:16–23; 2006.
- [14] Halestrap, A.; Clarke, S.; Khaliulin, I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta* **1767**:1007–1031; 2007.
- [15] Townsend, P. A.; Davidson, S. M.; Clarke, S. J.; Khaliulin, I.; Carroll, C. J.; Scarabelli, T. M.; Knight, R. A.; Stephanou, A.; Latchman, D. S.; Halestrap, A. P. Urocortin prevents mitochondrial permeability transition in response to reperfusion injury indirectly by reducing oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**:H928–H938; 2007.
- [16] Lo Iacono, L.; Boczkowski, J.; Zini, R.; Salouage, I.; Berdeux, A.; Motterlini, R.; Morin, D. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **50**:1556–1564; 2011.
- [17] Zini, R.; Berdeux, A.; Morin, D. The differential effects of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical on cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation. *Free Radic Res* **41**:1159–1166; 2007.
- [18] Leite, A. C.; Oliveira, H. C.; Utino, F. L.; Garcia, R.; Alberici, L. C.; Fernandes, M. P.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* **1797**:1210–1216; 2010.
- [19] Degli Esposti, M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta* **1364**:222–235; 1998.
- [20] Ohnishi, S. T.; Ohnishi, T.; Muranaka, S.; Fujita, H.; Kimura, H.; Uemura, K.; Yoshida, K.; Utsumi, K. A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **37**:1–15; 2005.
- [21] Ksenzenko, M.; Konstantinov, A. A.; Khomutov, G. B.; Tikhonov, A. N.; Ruuge, E. K. Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett* **155**:19–24; 1983.
- [22] Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* **45**:466–472; 2010.
- [23] Brown, G. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1504**:46–57; 2001.
- [24] Brown, G. Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta Physiol Scand* **168**:667–674; 2000.
- [25] Shiva, S.; Sack, M. N.; Greer, J. J.; Duranski, M.; Ringwood, L. A.; Burwell, L.; Wang, X.; MacArthur, P. H.; Shoja, A.; Raghavachari, N.; Calvert, J. W.; Brookes, P. S.; Lefer, D. J.; Gladwin, M. T. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* **204**:2089–2102; 2007.
- [26] Prime, T. A.; Blaikie, F. H.; Evans, C.; Nadtochiy, S. M.; James, A. M.; Dahm, C. C.; Vitturi, D. A.; Patel, R. P.; Hiley, C. R.; Abakumova, I.; Requejo, R.; Chouchani, E. T.; Hurd, T. R.; Garvey, J. F.; Taylor, C. T.; Brookes, P. S.; Smith, R. A.; Murphy, M. P. A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia–reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:10764–10769; 2009.
- [27] Navarro, A.; Boveris, A. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv Drug Delivery Rev* **60**:1534–1544; 2008.
- [28] Brown, G. C.; Borutaite, V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res* **75**:283–290; 2007.
- [29] Qiu, H.; Lizano, P.; Laure, L.; Sui, X.; Rashed, E.; Park, J. Y.; Hong, C.; Gao, S.; Holle, E.; Morin, D.; Dhar, S. K.; Wagner, T.; Berdeux, A.; Tian, B.; Vatner, S. F.; Depre, C. H11 kinase/heat shock protein 22 deletion impairs both nuclear and mitochondrial functions of Stat3 and accelerates the transition into heart failure on cardiac overload. *Circulation* **124**:406–415; 2011.
- [30] Wegrzyn, J.; Potla, R.; Chwae, Y. J.; Sepuri, N. B.; Zhang, Q.; Koeck, T.; Derecka, M.; Szczepanek, K.; Szelag, M.; Gornicka, A.; Moh, A.; Moghaddas, S.; Chen, Q.; Bobbili, S.; Cichy, J.; Dulak, J.; Baker, D. P.; Wolfman, A.; Stuehr, D.; Hassan, M. O.; Fu, X. Y.; Avadhani, N.; Drake, J. I.; Fawcett, P.; Lesnfsky, E. J.; Larner, A. C. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* **323**:793–797; 2009.
- [31] Nisoli, E.; Clementi, E.; Paolucci, C.; Cozzi, V.; Tonello, C.; Sciorati, C.; Braicale, R.; Valerio, A.; Francolini, M.; Moncada, S.; Carruba, M. O. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**:896–899; 2003.
- [32] Nisoli, E.; Falcone, S.; Tonello, C.; Cozzi, V.; Palomba, L.; Fiorani, M.; Pisconti, A.; Brunelli, S.; Cardile, A.; Francolini, M.; Cantoni, O.; Carruba, M. O.; Moncada, S.; Clementi, E. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:16507–16512; 2004.
- [33] McLeod, C. J.; Pagel, I.; Sack, M. N. The mitochondrial biogenesis regulatory program in cardiac adaptation to ischemia—a putative target for therapeutic intervention. *Trends Cardiovasc Med* **15**:118–123; 2005.
- [34] Zoccarato, F.; Cavallini, L.; Bortolami, S.; Alexandre, A. Succinate modulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release at NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in brain mitochondria. *Biochem J* **406**:125–129; 2007.
- [35] Muller, F. L.; Liu, Y.; Abdul-Ghani, M. A.; Lustgarten, M. S.; Bhattacharya, A.; Jang, Y. C.; Van Remmen, H. High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J* **409**:491–499; 2008.
- [36] Lambert, A. J.; Boysen, H. M.; Buckingham, J. A.; Yang, T.; Podlutzky, A.; Austad, S. N.; Kunz, T. H.; Buffenstein, R.; Brand, M. D. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* **6**:607–618; 2007.
- [37] Skulachev, V. P. A biochemical approach to the problem of aging: “mega-project” on membrane-penetrating ions. The first results and prospects. *Biochemistry (Moscow)* **72**:1385–1396; 2007.
- [38] Chen, Q.; Moghaddas, S.; Hoppel, C. L.; Lesnfsky, E. J. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* **294**:C460–C466; 2008.
- [39] Lambert, A. J.; Buckingham, J. A.; Boysen, H. M.; Brand, M. D. Diphenyleneiodonium acutely inhibits reactive oxygen species production by mitochondrial complex I during reverse, but not forward electron transport. *Biochim Biophys Acta* **1777**:397–403; 2008.
- [40] Lesnfsky, E. J.; Chen, Q.; Moghaddas, S.; Hassan, M. O.; Tandler, B.; Hoppel, C. L. Blockade of electron transport during ischemia protects cardiac mitochondria. *J Biol Chem* **279**:47961–47967; 2004.
- [41] Aldakkak, M.; Stowe, D. F.; Chen, Q.; Lesnfsky, E. J.; Camara, A. K. Inhibited mitochondrial respiration by amobarbital during cardiac ischaemia improves redox state and reduces matrix Ca<sup>2+</sup> overload and ROS release. *Cardiovasc Res* **77**:406–415; 2008.

## **Résultat 2 : La sur-expression de la protéine Hsp22 réduit l'atteinte des fonctions mitochondriales sur un modèle d'ischémie-reperfusion régionale**

Ce travail est complémentaire de la première étude et n'a pas encore été publié.

### **1 Objectif de l'étude**

La première étude a été réalisée en absence de stress ischémique ou sur un modèle *in vitro* d'anoxie-réoxygénation sur mitochondries isolées et a permis de montrer qu'à l'état basal, la sur-expression de la protéine Hsp22 induisait des modifications de la fonction respiratoire mitochondriale qui pouvaient participer à son effet cardioprotecteur. Cette étude complémentaire a pour objectif d'étudier les mêmes fonctions mitochondriales après un stress ischémique réalisé sur animal entier.

### **2 Protocoles expérimentaux**

Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle murin transgénique sur-exprimant la protéine Hsp22 spécifiquement dans le myocarde (TG) ainsi que leurs congénères de type sauvages (WT). Un modèle d'ischémie par occlusion de l'artère coronaire gauche de 45 min suivie d'une reperfusion de 15 min ou de 24 h a été réalisé sur ces animaux. Une reperfusion de 24 h a été utilisée pour la mesure de la taille d'infarctus.

Une reperfusion de 15 min a été utilisée pour l'étude des fonctions mitochondriales. Les mitochondries issues de l'aire à risque ont été extraites et différents paramètres ont été étudiés :

- la consommation d'oxygène en présence de différents types de substrats à l'aide d'une électrode de Clark ;
- la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans différentes conditions de substrats et en présence d'un ou plusieurs inhibiteurs de certains complexes de la chaîne respiratoire par spectrofluorescence ;
- l'ouverture du mPTP en analysant le gonflement de la mitochondrie induit par le calcium par spectrophotométrie ;
- la capacité de rétention calcique des mitochondries par spectrofluorimétrie.

### 3 Résultats

#### 3.1 Hsp22 diminue la taille de l'infarctus

Nos résultats ont permis de confirmer l'effet cardioprotecteur de Hsp22 précédemment décrit (Depre *et al.*, 2006a). En effet, pour une aire à risque similaire ( $49,1 \pm 1,8$  chez les WT vs  $47,0 \pm 1,6$  chez les TG) la taille de l'infarctus est réduite de 75,6% chez les souris TG par rapport aux souris WT (figure 24).

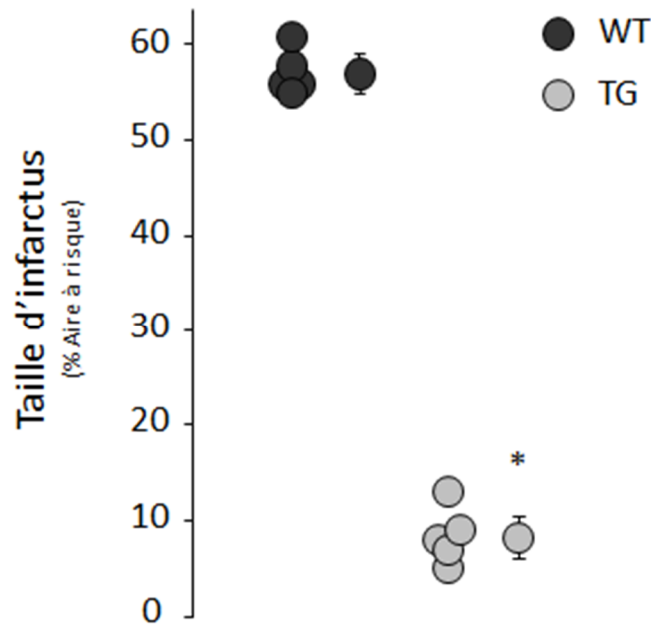


Figure 24 : Hsp22 réduit la taille d'infarctus. La taille de l'infarctus a été calculée en % de l'aire à risque chez les souris WT et TG après 45 min d'ischémie et 24 heures de reperfusion. Chaque valeur individuelle ainsi que la moyenne  $\pm$  sem correspondante sont représentées par un cercle. \*  $p < 0,05$  vs WT.

#### 3.2 Hsp22 améliore l'activité de la chaîne respiratoire après ischémie-reperfusion

Après ischémie-reperfusion chez les souris WT, la vitesse de consommation basale d' $O_2$  par la chaîne respiratoire (stade 4) n'est pas modifiée. En revanche, la vitesse de consommation d' $O_2$  lors de la synthèse d'ATP (stade 3) est fortement diminuée chez ces animaux (figure 25A) ce qui se traduit par une diminution significative du coefficient respiratoire (figure 25B). La fonction respiratoire mitochondriale est donc altérée par l'ischémie-reperfusion chez les souris WT. Chez les souris TG le stade 4 et le stade 3 sont significativement diminués après ischémie-reperfusion mais le coefficient respiratoire n'est pas modifié, il s'agit donc plutôt d'une inhibition de la chaîne respiratoire (figure 25A et B).

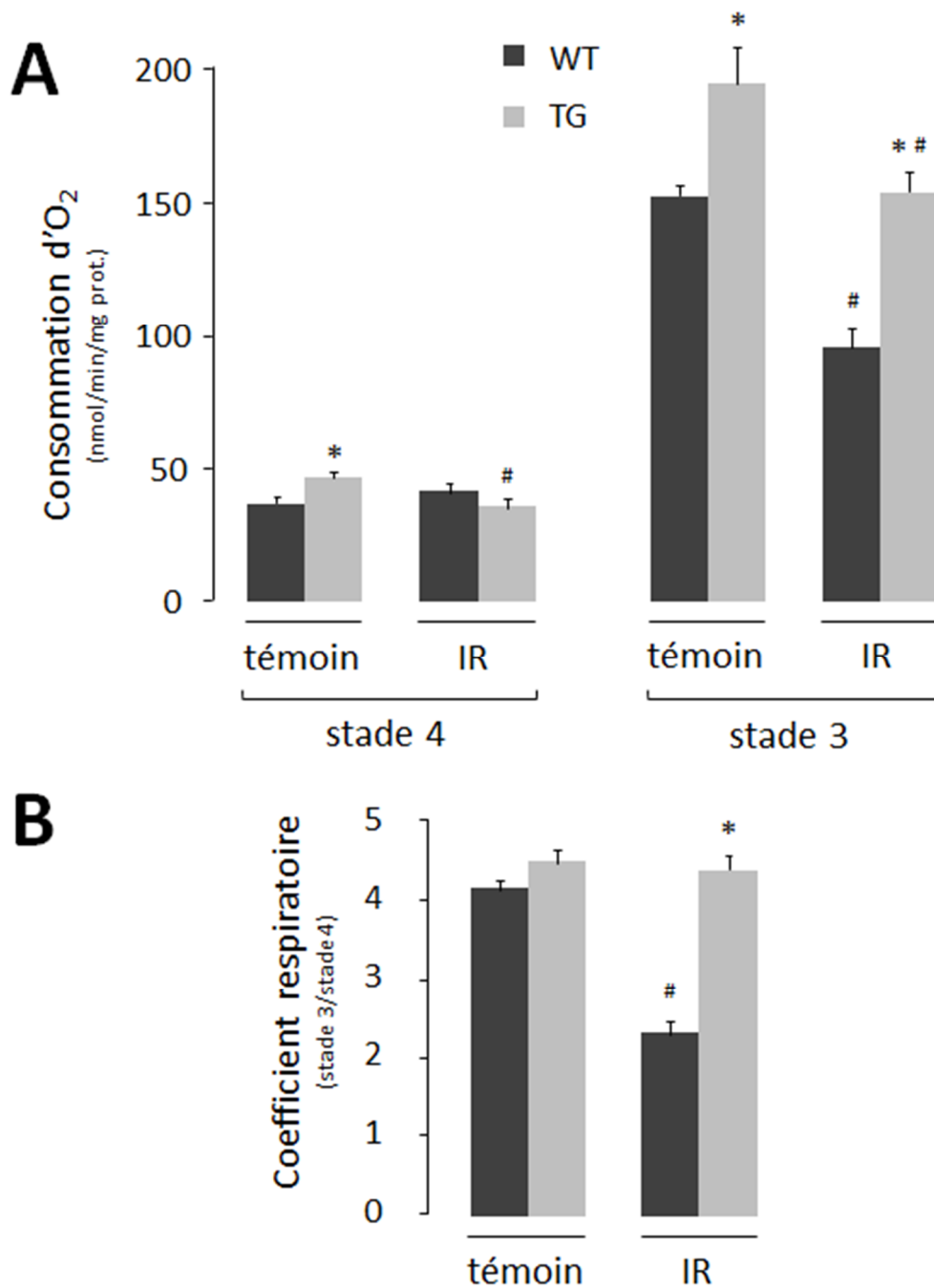


Figure 25 : Hsp22 limite l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale après ischémie-reperfusion. Les mitochondries de l'aire à risque de cœur de souris ayant subi (IR) ou non (témoin) une ischémie-reperfusion ont été extraites.

A : Consommation d'O<sub>2</sub> induite par l'ajout de pyruvate/malate en absence (stade 4) ou en présence d'ADP (stade 3). B : Coefficient respiratoire (stade 3/stade 4).

\* p<0,05 vs WT correspondant. # p<0,05 vs témoin correspondant. Chaque valeur correspond à la moyenne ± sem de 6 à 8 expériences indépendantes.

### 3.3 La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'est pas modifiée après ischémie-reperfusion

Après ischémie-reperfusion, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la chaîne respiratoire mitochondriale n'est pas modifiée et les différences entre les souris WT et TG restent identiques à celles observées à l'état de base (voir Résultat 1, paragraphe 3.2). Seule la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par le retour des électrons est inhibée chez les souris WT après ischémie-reperfusion (figure 26).

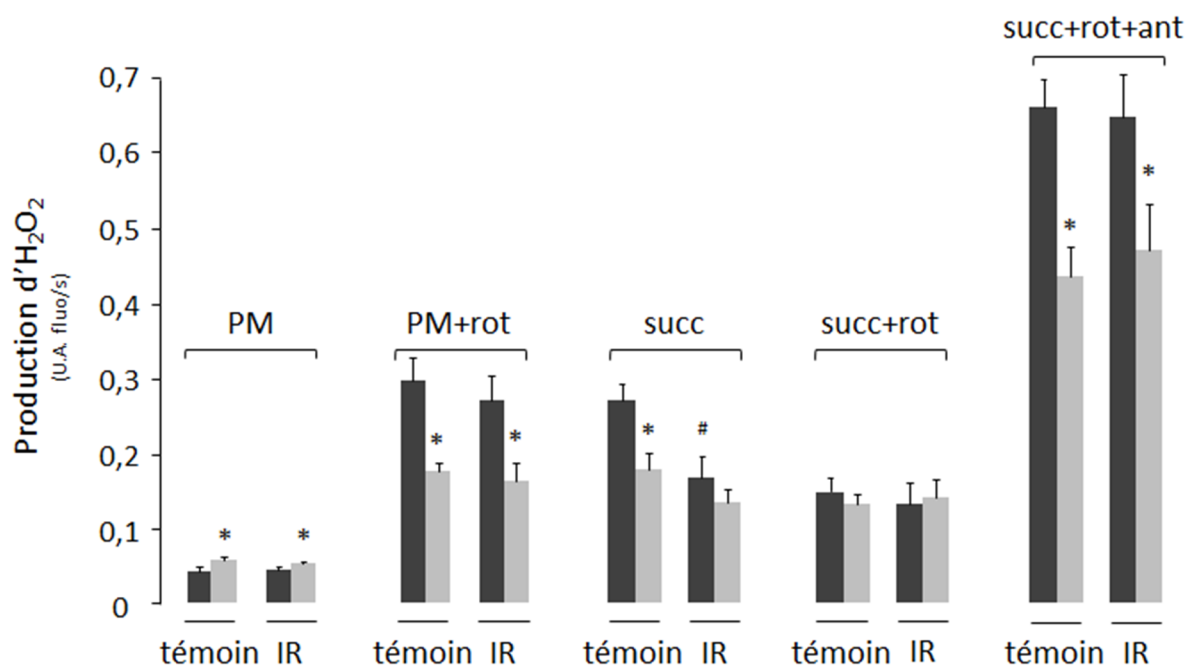


Figure 26 : L'ischémie-reperfusion ne modifie pas la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la chaîne respiratoire. La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de différents substrats et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire à été mesurée sur des mitochondries de souris WT et TG ayant subi (IR) ou non (témoin) une ischémie-reperfusion.

\* p<0,05 vs WT correspondant. # p<0,05 vs témoin correspondant. Chaque valeur correspond à la moyenne ± sem de 6 à 8 expériences indépendantes. PM, pyruvate/malate ; rot, roténone ; succ, succinate ; ant, antimycine.

### 3.4 Hsp22 limite l'ouverture du mPTP après ischémie-reperfusion

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'effet de la sur-expression de Hsp22 sur l'ouverture du mPTP après ischémie-reperfusion : la mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries et l'étude de la vitesse de gonflement mitochondrial induit par le Ca<sup>2+</sup>. Après ischémie-reperfusion, la capacité de rétention calcique est fortement diminuée chez les souris WT (-53 %). En revanche, chez les souris TG l'ischémie-reperfusion ne modifie

pas significativement la rétention calcique (figure 27). Ceci indique que la protéine Hsp22 limite la sensibilisation des mitochondries au  $\text{Ca}^{2+}$  après ischémie-reperfusion.

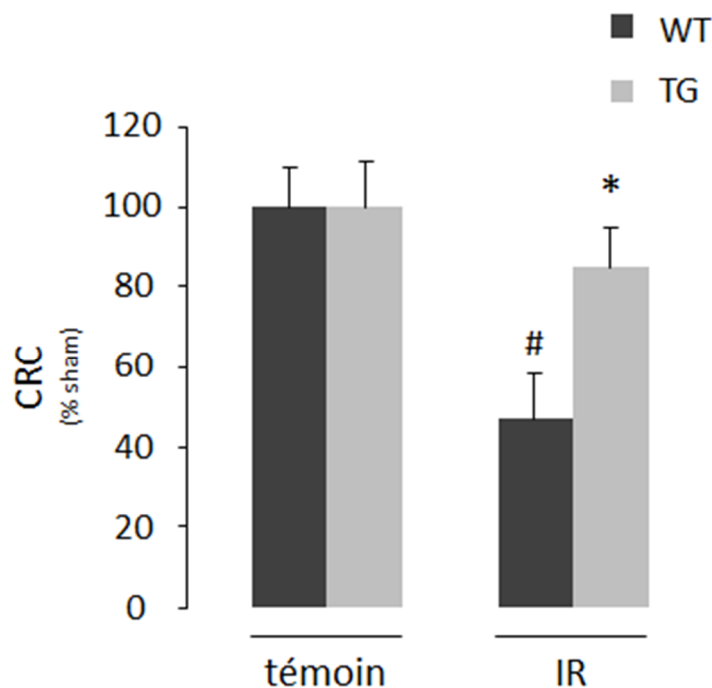


Figure 27 : Hsp22 améliore la capacité de rétention calcique après ischémie-reperfusion. Les mitochondries isolées à partir de l'aire à risque de myocarde de souris ayant subi 45 min d'ischémie et 15 min de reperfusion (IR) ont été incubées dans du tampon de respiration. Des quanta de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  ont été ajoutés pour déterminer la capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries. \*  $p < 0,05$  vs WT correspondant. #  $p < 0,05$  vs témoin correspondant. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  sem de 6 à 8 expériences indépendantes.

A l'état de base, la vitesse du gonflement mitochondrial induit par le  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie est significativement diminuée chez les souris TG. L'ischémie-reperfusion augmente significativement la vitesse de gonflement de la mitochondrie induite par le calcium chez les souris WT. Ceci témoigne d'une ouverture plus rapide du mPTP conséquent à l'atteinte mitochondriale liée à l'ischémie-reperfusion. En revanche, la vitesse de gonflement mitochondriale n'est pas augmentée chez les souris TG après ischémie-reperfusion (figure 28).



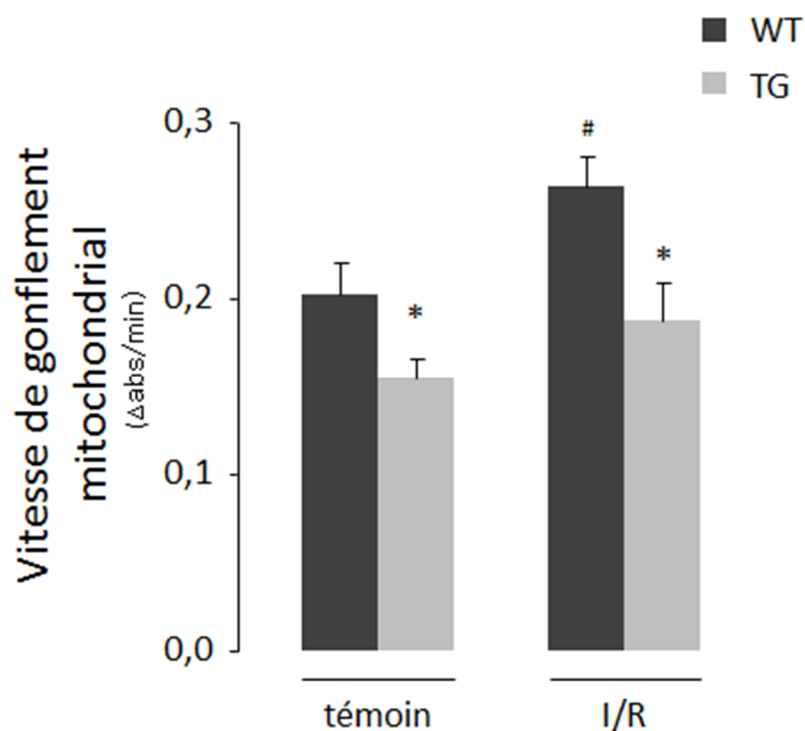


Figure 28 : Hsp22 limite le gonflement mitochondrial induit par l'ischémie-reperfusion. Les mitochondries isolées à partir de l'aire à risque de myocarde de souris ayant subi 45 min d'ischémie et 15 min de reperfusion (IR) ont été incubées dans du tampon de respiration. Le gonflement mitochondrial a été induit par 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ . \*  $p < 0,05$  vs WT correspondant. #  $p < 0,05$  vs témoin correspondant. Chaque valeur correspond à la moyenne  $\pm$  sem de 6 à 8 expériences indépendantes.

#### 4 Conclusion

Après ischémie-reperfusion, la taille de l'infarctus est fortement diminuée chez les souris TG par rapport aux souris WT et l'atteinte des fonctions mitochondriales est limitée chez les souris TG. On observe en effet chez ces souris une diminution de la respiration mais il s'agit plutôt d'une inhibition de la chaîne respiratoire que d'une atteinte de la fonction de synthèse de l'ATP. Ceci pourrait être dû au NO qui comme nous l'avons montré précédemment (Résultat 1, paragraphe 3.3 et 3.6) est produit en plus grande quantité dans les mitochondries de souris TG et exacerbe l'inhibition de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale après anoxie-reoxygénation sur mitochondries isolées chez les souris TG.

L'ischémie-reperfusion n'a pas d'effet sur la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par la chaîne respiratoire mitochondriale chez les souris TG. Le seul effet observé concerne l'inhibition du retour des électrons du complexe II vers le complexe I chez les souris WT. A l'inverse, nos résultats précédents (Résultat 1 paragraphe 3.6) mettaient en évidence une réduction de la

production d'ERO par les mitochondries de souris TG après anoxie-réoxygénation *in vitro*. Cette absence d'effet de l'ischémie-reperfusion *in vivo* pourrait s'expliquer par le fait que dans le modèle *in vitro* la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesurée au moment de la réoxygénation tandis que dans le modèle *in vivo* elle est mesurée après 15 min de reperfusion, à un moment où les mitochondries les plus endommagées ne fonctionnent plus et ne produisent plus d'ERO.

Enfin, les mitochondries issues des cœurs de souris TG après ischémie-reperfusion présentent une moindre sensibilité au calcium et une ouverture du mPTP limitée comparée à celles de souris WT.

Pour conclure, l'atteinte mitochondriale est largement diminuée chez les souris TG après ischémie-reperfusion ce qui peut participer aux effets cardioprotecteurs de Hsp22.

## **Résultat 3 : Le stress oxydant est un acteur majeur de l'hypertrophie myocardique et de la mort prématurée chez la souris sur-exprimant Hsp22 dans le myocarde**

Ce travail, qui a fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe du Dr Depre (New Jersey Medical School, Newark, Etats-Unis), va être soumis à publication dans le journal Basic Research in Cardiology.

### **1 Objectif de l'étude**

Nous avons récemment montré que la protéine Hsp22 active le facteur de transcription STAT3 et favorise sa translocation vers la mitochondrie où il participe à la stimulation de la phosphorylation oxydative (Qiu *et al.*, 2011). Ceci est associé à une stimulation de la production d'ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale (Laure *et al.*, 2012). Or, les ERO sont des médiateurs clés dans la physiopathologie cardiaque puisqu'ils participent à l'effet cardioprotecteur du PCI (Baines *et al.*, 1997 ; Hausenloy and Yellon, 2007) mais également au développement de l'hypertrophie myocardique (Maulik and Kumar, 2012) et du vieillissement prématuré (Gilca *et al.*, 2007).

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer si la production d'ERO ne serait pas, tout du moins en partie, responsable des différents effets induits par la sur-expression de la protéine Hsp22.

### **2 Protocoles expérimentaux**

Pour cette étude, nous avons utilisé le modèle murin transgénique sur-exprimant la protéine Hsp22 spécifiquement dans le myocarde ainsi que leurs congénères de type sauvages. Les animaux qui ne sont entrés dans aucun protocole ont été utilisés pour tracer les courbes de survie des animaux WT et TG. Afin d'étudier le rôle des ERO dans ce modèle transgénique, les animaux ont été traités par un antioxydant : le 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (tempol, 100 mg/kg/jour, *per os*), administré quotidiennement depuis le sevrage jusqu'au sacrifice. Un modèle d'ischémie par occlusion de l'artère

coronaire gauche de 45 min suivi de 4 h de reperfusion a été utilisé pour mesurer la taille de l'infarctus.

Après extraction du myocarde de ces animaux, différents paramètres ont été étudiés :

- 1) L'hypertrophie a été évaluée en calculant le rapport du poids du ventricule gauche sur la longueur tibiale.
- 2) Le vieillissement cellulaire a été étudié en analysant la présence de différents marqueurs :
  - les cellules positives pour la  $\beta$ -galactosidase ont été identifiées sur des coupes de cœur ;
  - les niveaux d'ARNm des protéines p16, p19, p21, p53 ont été estimés par RT-PCR quantitative dans des homogénats de cœur ;
  - l'activité de l'enzyme télomérase a été étudiée dans des homogénats de cœur ;
  - l'ADN a été isolé et la longueur des télomères mesurées.
- 3) Le niveau de stress oxydant a été évalué dans le myocarde de souris WT et TG en calculant le rapport glutathion réduit (GSH) sur glutathion oxydé (GSSG) puis la production d'ERO par 3 sources cellulaires majeures a été mesurée sur des homogénats de cœur (pour la NADPH et la xanthine oxydase) ou sur des mitochondries fraîchement isolées (pour la chaîne respiratoire mitochondriale).
- 4) L'expression des protéines impliquées dans l'effet cardioprotecteur ou hypertrophique de Hsp22 a été déterminée par Western-Blot (PKC $\epsilon$ , iNOS, STAT3, AMPK et Akt).

### **3 Résultats**

3.1 La sur-expression d'Hsp22 réduit la durée de vie et est associée à l'apparition de marqueurs de sénescence.

La durée de vie des souris TG est fortement diminuée par rapport aux souris WT. Ceci est associé à l'apparition de marqueurs de sénescence dans le myocarde des souris TG avec l'apparition de cellules positives pour la  $\beta$ -galactosidase et l'augmentation de l'expression des ARNm des protéines p16 et p19 spécifiquement dans le myocarde. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une différence de taille des télomères entre les souris TG

et WT, mais en revanche l'activité de la télomérase est fortement augmentée chez les souris TG par rapport aux souris WT chez lesquelles elle est quasiment nulle.

### 3.2 La sur-expression d'Hsp22 induit un stress oxydant

Le ratio GSH:GSSG est augmenté dans le myocarde des souris TG par rapport aux WT. Ceci est associé à l'augmentation de la production d'ERO par les 3 sources cellulaires d'ERO étudiées. Ainsi, l'activité et l'expression de la NADPH oxydase, l'activité de la xanthine oxydase et la production d'ERO de la chaîne respiratoire mitochondriale sont augmentées chez les souris TG.

### 3.3 Le traitement tempol abolit le stress oxydant chez la souris TG

Le traitement tempol ne modifie pas le ratio GSH:GSSG chez les souris WT par contre il prévient la diminution observée chez les souris TG. Ceci est associé à une inhibition de la surproduction d'ERO causée par les sources cellulaires étudiées. En effet, le traitement par le tempol abolit l'augmentation d'expression et d'activité de la NADPH oxydase. L'effet est similaire pour la xanthine oxydase et la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 3.4 Rôle du stress oxydant dans l'hypertrophie, la cardioprotection et la sénescence induites par Hsp22

Le traitement par le tempol réduit significativement le rapport poids du ventricule gauche sur longueur tibiale chez les souris TG ce qui indique que le stress oxydant participe au développement de l'hypertrophie chez ces animaux. Ceci est associé à l'inhibition de l'activation d'Akt par Hsp22. Cette activation d'Akt a été impliquée dans l'effet hypertrophique de Hsp22 et son inhibition pourrait être le mécanisme par lequel le tempol réduit l'hypertrophie.

Le traitement tempol a permis d'augmenter la durée de vie chez les animaux TG celle-ci devenant comparable à celle des animaux WT. Cet effet s'accompagne d'une diminution des niveaux d'ARNm des protéines p16 et p19 dans le myocarde des souris TG traitées.

Enfin, le traitement tempol n'a pas modifié la taille de l'infarctus après ischémie-reperfusion, ni chez les souris TG ni chez les souris WT. Ceci est associé au maintien de l'augmentation de l'expression des protéines qui participent à l'effet cardioprotecteur d'Hsp22 c'est à dire PKC $\epsilon$ , pAMPK, iNOS et STAT3.

### 3.5 L'effet cardioprotecteur conféré par Hsp22 n'est pas altéré chez les souris âgées

Les stratégies cardioprotectrices perdent de leur efficacité avec l'âge et nous avons montré que les souris sur-exprimant Hsp22 présentent un vieillissement prématuré. Il était donc légitime de se demander si l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22 diminuait chez des animaux TG « agés ». La taille de l'infarctus a donc été mesurée chez des animaux de 25-30 semaines, âge pour lequel plus de 50% des souris TG meurent. Les résultats indiquent que l'effet cardioprotection est maintenu chez les souris TG avec l'âge.

## 4 Conclusion

Si l'activation chronique des voies de survie par Hsp22 permet d'obtenir un effet cardioprotecteur sur le long terme, ceci s'accompagne d'une augmentation globale de la production d'ERO induisant un stress oxydant qui participe à l'hypertrophie ainsi qu'à la réduction de la durée de vie induites par la sur-expression de la protéine Hsp22. Un traitement antioxydant permet de prévenir ce stress oxydant, de réduire l'hypertrophie et d'augmenter la durée de vie chez les animaux transgéniques sans toutefois altérer l'effet cardioprotecteur d'Hsp22.

# **Dual role of Hsp22 overexpression in mice on cardioprotection, myocardial hypertrophy, senescence and life span**

**Romain Long<sup>1</sup>, Lydie Laure<sup>1</sup>, Christophe Depre<sup>2</sup>, Bijan Ghaleh<sup>1</sup>, Alain Berdeaux<sup>1</sup>,  
Didier Morin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>INSERM, U955, équipe 03 et Université Paris-Est, Faculté de Médecine, F-94010, Créteil-France; <sup>2</sup>Cardiovascular Research Institute, Department of Cell Biology and Molecular Medicine, University of Medicine and Dentistry New Jersey, New Jersey Medical School, Newark, NJ.

To whom correspondence should be addressed:

Didier Morin, PhD, Faculté de Médecine de Créteil, INSERM U955-équipe 03, 8 rue du Général Sarrail, 94010 Créteil Cedex, France. Fax: +33 (0) 1 48 98 17 77. Email:

[didier.morin@inserm.fr](mailto:didier.morin@inserm.fr)

Key words: Hsp22 overexpression, cardioprotection, oxidative stress, myocardial hypertrophy, senescence, life span.

## **Abstract**

H11 kinase/Hsp22 (Hsp22) is a small heat shock protein upregulated by cardiac overload and ischemia/reperfusion injury. Its cardiac-specific overexpression in transgenic (TG) mice induces a chronic and stable myocardial hypertrophy through activation of Akt pathway and a permanent and powerful cardioprotection equivalent to preconditioning.

Hsp22 also increases oxidative phosphorylation and enhances the production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS). ROS have emerged as key mediators in cardiac pathophysiology, as survival signal triggering ischemic preconditioning but also as stimuli of pathways leading to cardiac hypertrophy and ageing. Therefore, we tested the hypothesis whether ROS production is necessary for the physiological response induced by Hsp22 overexpression.

Wild type (WT) and TG mice were bred in similar conditions and survival curves were plotted. To study the role of ROS, mice were treated daily with the antioxidant Tempol from weaning to their sacrifice. Senescence markers ( $\beta$ -galactosidase positive cells, telomere length, telomerase activity and p16, p19, p21, p53 mRNA levels) were measured in the heart from WT and TG mice. Oxidized (GSSG)/reduced (GSH) glutathione ratio evaluating oxidative stress, and ROS production from 3 major cellular sources (mitochondrial respiratory chain, NADPH and xanthine oxidase) were measured in cardiac tissue and isolated mitochondria.

TG mice showed a reduction of 48% in their mean life span compared to WT mice. This was associated with a significant increase in markers of senescence, such as p16, p19, p21, p53 mRNA levels as well as the percentage of  $\beta$ -galactosidase positive cells and telomerase activity. Hearts from TG mice exhibited a decrease in GSH:GSSG ratio together with increased ROS production from all sources. Chronic tempol treatment abolished oxidative stress and overproduction of ROS in TG mice. It reduced myocardial hypertrophy and Akt phosphorylation in TG mice. Tempol also significantly extended life span and prevented ageing markers in TG mice. Interestingly, the cardioprotective effect conferred by Hsp22 remained identical after tempol treatment in relation with maintained activation of survival pathways (AMPK $\alpha$ , iNOS, PKC $\epsilon$  and STAT3) and was not abolished in aged TG mice.

Taken together, these results show that permanent stimulation of cardioprotective pathways are accompanied by a simultaneous and powerful increased oxidative stress responsible for myocardial hypertrophy and reduced life span.



## Introduction

The stress-responsive Heat shock protein 22 (Hsp22) is highly expressed in the heart and skeletal muscle (Depre et al., 2002; Acunzo et al., 2012) and involved in the response to the two most common forms of cardiac cell stress, i.e. overload and hypoxia. Its cardiac expression is increased in various models of cardiac hypertrophy and ischemia, including human patients, underlying a possible participation in the mechanisms of cardiac cell growth and cell survival (Depre et al., 2004). It was previously shown that a transgenic (TG) mouse model with cardiac-specific overexpression of Hsp22, reproducing the increased expression found in patients, is characterized by a pattern of chronic and stable myocardial hypertrophy with normal contractile function (Depre et al., 2002; Hedhli et al., 2008). Hsp22 overexpression in mice induces also a powerful cardioprotection, reproducing many hallmarks of the ischemic preconditioning including activation of cell survival pathways (more particularly Pi3K-Akt), upregulation of heat shock proteins, inhibition of proapoptotic proteins, metabolic adaptation and stimulation of growth pathways (Danan et al., 2007). Interestingly, mitochondrial Hsp22 was also shown to regulate life span in *Drosophila* (Morrow et al., 2004).

We recently showed that Hsp22 activates the transcription factor STAT3 and stimulates its translocation to mitochondria where it increases oxidative phosphorylation (Qiu et al., 2011). This was associated with an enhancement of the production of mitochondrial reactive oxygen species (Laure et al., 2012). Reactive oxygen species (ROS) have emerged as key mediators in cardiac pathophysiology, playing a dual role as survival signal triggering ischemic preconditioning (Baines et al., 1997; Hausenloy and Yellon, 2007) on the one hand but also as stimuli of pathways leading to cardiac hypertrophy (Maulik and Kumar, 2012) and ageing (Gilca et al., 2007) on the other hand. We do not know however the exact role of ROS production for these physiological responses resulting from Hsp22 overexpression.

Therefore, in the present study we tested the hypothesis that the increase in ROS production could be a common mechanism by which Hsp22 overexpression induces cardioprotection, hypertrophy and modulates life span. To test this hypothesis we first compared the life span and levels of cardioprotection of wild type (WT) and TG mice and characterized their ROS production and oxidative stress. Then we compared these responses after a chronic treatment

with the whole cell antioxidant tempol which is a superoxide dismutase mimetic agent that has been shown to reduce oxidative stress in mice ([Ritchie et al., 2007](#)).

## **Material and methods**

### *Animal model*

We used TG mice (3–4 months of age), expressing the coding sequence of human Hsp22 and a C-terminal hemagglutinin tag and their WT littermates. When indicated, mice were treated with the antioxidant 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (tempol, 100 mg/kg, po) administered daily for 7-9 weeks from the weaning to the day of sacrifice.

Ischemia/reperfusion was induced by occlusion of the left anterior descending artery for 45 min followed by 4 hours of reperfusion. Area at risk (AAR) was measured with Evan's blue and infarct size (IS) with triphenyltetrazolium chloride as previously described ([Pons et al., 2013](#)).

WT and TG mice which were not used in any protocol were bred in the same conditions until their death and a survival curves were plotted. The mean life span was calculated using Kaplan-Meier analysis.

To establish the survival curve with tempol treatment, mice were fed with tempol (100 mg/kg/day) or with vehicle (water) during 27 weeks (or until the natural death).

All animal procedures used in this study were in strict accordance with the European Community Council Directive 2010/63/EU and recommendations of the French Ministère de l'Agriculture. All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee Afssa/ENVA/Universite Paris Est Creteil (approval number 09/10/12-5).

### *Isolation of fresh cardiac mitochondria*

Left ventricular tissue was homogenized in a buffer (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM Hepes, 2 mM EGTA, pH 7.4 at 4 °C) supplemented with 0.25% bovine serum albumin, using a Potter–Elvehjem glass homogenizer in a final volume of 10 ml. The homogenate was filtered through cheese cloth and centrifuged at 1000g for 5 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. The mitochondrial pellet was resuspended in 50 ml of homogenization buffer without EGTA and bovine serum albumin and the supernatant was kept to assess NADPH oxidase and xanthine oxidase activity measurements. For Western blot experiments homogenization buffer was supplemented with protease, kinase, and phosphatase inhibitors.

### *Determination of mitochondrial reactive oxygen species production*

ROS generation was assessed by measuring the rate of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production through oxidation of Amplex red to fluorescent resorufin, coupled to the enzymatic reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by horseradish peroxidase. Superoxide anion generated in mitochondria was converted endogenously to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measured by the assay. Briefly, Amplex red (10 mM) and horseradish peroxidase (1 U/ml) were added to isolated mitochondria (0.2 mg protein) in the respiration buffer maintained at 30 °C. The reaction was initiated by addition of the respiratory substrates (pyruvate/malate or succinate, 5 mM). The subsequent increase in fluorescence was monitored over time using a fluorescence spectrometer (PerkinElmer SA LS 50B, excitation wavelength 563 nm; emission wavelength 587 nm).

### *Western blot analysis*

Proteins were denatured by boiling, resolved on SDS-PAGE 10% polyacrylamide gels, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in a Tris buffer (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5) containing 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature. Subsequently, membranes were exposed for 12 h at 4°C to anti-iNOS (1:1000; Cell Signaling), anti-STAT-3 (1:2000; Cell Signaling), anti-PKCε (1:2000, Santa Cruz), anti-Nox2/gp91phox (1:2000; Abcam), anti-Akt (1:2000; Cell Signaling), anti-pAkt (Ser 473, 1:2000; Cell Signaling), anti-AMPK (1:2000, Cell Signaling), anti-pAMPK (1:2000, Cell Signaling) and anti-actin (1:2000; Cell Signaling). After incubation with goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) or goat anti-rabbit (Cell Signaling) as a secondary antibody at 1:5000, blots were revealed by *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) in a G:BOX chemi XT4 (Syngene). Bands were analyzed by densitometry with Genesys software (Syngene).

### *Quantitative RT-PCR*

Hearts were sampled from TG and WT mice. Total RNA was isolated from mouse heart using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized from 1 mg of total RNA using the SuperScript first-strand synthesis system for the RT-PCR kit (Invitrogen) and random oligonucleotides. Expression of genes encoding p53, p16, p21, p19 was monitored by a real-time qRT-PCR method using an Applied Biosystems 7000 real-time PCR system. The ubiquitous 18S RNA was used to normalize the data across samples. Its expression was monitored by SYBRGreen incorporation. Each experiment was performed in duplicate and repeated at least twice on at least 4 animals.

### *Telomere length*

After genomic DNA extraction using DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche), DNA was digested with specific enzymes. Then DNA fragments were separated by electrophoresis and transferred by Southern blot. DNA was detected by hybridizing a specific digoxigenin-coupled probe and anti-digoxigenin antibody coupled with alkaline phosphatase that had allowed chemiluminescent detection. Densitometry measure was used to determine telomere length.

### *Telomerase activity*

Telomerase activity was analyzed with a *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>* (kit Roche), in accordance with the manufacturer's instructions. This was assessed in 3 successive steps: 1) protein extraction and dosage, 2) elongation/amplification and 3) detection with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The absorbance was measured at 450 nm and telomerase activity calculated.

### *GSH:GSSG ratio*

Oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione levels were determined using enzymatic recycling method ([Rahman et al., 2006](#)) in WT and TG mice. GSH:GSSG ratio was used as an index of oxidative stress.

### *NADPH oxidase activity*

NADPH oxidase activity was measured in cardiac homogenate from WT and TG mice as the apocynin-inhibitable superoxide anion production induced by NADPH. Superoxide anion production was evaluated with nitroblue tetrazolium which is reduced by superoxide anion in formazan. Briefly, samples (1 mg/mL) were introduced in a phosphate buffer saline maintained at 30°C in the presence of NADPH (20 mM) and the apparition of formazan was followed spectrophotometrically (560 nm). Apocynin (1 mM) was added to evaluate specific NADPH oxidase formation of superoxide anion.

### *Xanthine oxidase activity*

Xanthine oxidase activity was measured in cardiac homogenate from WT and TG mice by monitoring the increase in absorbance resulting from the apparition of uric acid produced by xanthine oxidase. Samples (2 mg/mL) were introduced in a phosphate buffer saline

maintained at 30°C. The reaction was initiated by addition of xanthine (100 µM) and uric acid production was followed spectrophotometrically (290 nm). A blank was obtained in the same conditions but in absence of xanthine.

#### *Statistical analysis*

Results are presented as the mean  $\pm$  sem for the number of samples indicated in the legends. Statistical comparison was performed using the Student t test, with statistical significance set at  $p < 0.05$ . Two-way analysis of variance followed by Scheffe's post-test was used for multi-group comparison. The statistics for survival was determined by the Log-Rank Test.

## Results

### ***1) Myocardial Hsp22 overexpression reduces life span and is associated with senescence markers in mice.***

To assess the effect of myocardial Hsp22 overexpression on longevity, we examined the life span of WT and TG mice (Fig. 1A). Life span of TG mice was shortened compared to WT, and substantial differences in survival mice were observed from week 10 (Fig. 1A), with TG mice dying at a faster rate. The life span of TG mice did not exceed 60 weeks whereas 30 % of WT mice stayed alive at this age. The mean life span was  $27.1 \pm 1.49$  and  $52.7 \pm 3.31$  weeks for TG and WT mice, respectively.

This reduction of life span in TG mice was associated with the presence of  $\beta$ -galactosidase positive cells, well-known markers of senescence, which were already present in the myocardium of young adult TG mice (10-12 week old) whereas they were not detectable in WT mice of the same age.

At the molecular level, senescent cells were characterized by an overexpression of cell cycle inhibiting proteins (Bringold and Serrano, 2000). We observed that the cell cycle inhibitors p16 and p19 (Fig. 1C) increased in myocardium of young adult TG mice compared to WT mice whereas expressions of the transcription factor p53 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 were not modified. The enhancement of p16 and p19 was specific of the myocardium as it was not found in the kidney (Fig. 1C), confirming that the effect was related to Hsp22 overexpression. A typical feature of senescent cells is the decrease in the telomere length and to confirm the senescent profile of the myocardium of TG mice, we compared the telomere length of the genomic DNA extracted from WT and TG mice. As shown in Figure 1D, we did not observe any significant variation of the length of telomeres between WT and TG mice. This could be due to the fact that the telomeres of the murine DNA are large, which makes very difficult the detection of the reduction of their size. Figure 1D also shows that myocardium from TG mice displayed a very high activity of telomerase as compared to WT mice.

### ***2) Myocardial Hsp22 overexpression induced oxidative stress***

To evaluate the oxidative stress, we measured the concentrations of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in whole myocardial homogenates of 10-12 week old mice. While concentrations of GSH were unchanged in TG compared to WT mice ( $804 \pm 46$  and  $894 \pm 89$  nmol/g tissue in WT and TG mice, respectively), the amount of GSSG increased in TG mice ( $489 \pm 17$  nmol/g tissue) compared to WT mice ( $307 \pm 17$  nmol/g tissue;  $p < 0.05$ ). This

resulted in a lower GSH:GSSG ratio in TG mice (Fig. 2A). Several sources of ROS are responsible for the enhancement of oxidative stress in TG mice. The first one is the mitochondrial respiratory chain. Indeed, Figure 2B confirms our previous results demonstrating that Hsp22 overexpression increases the net production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from mitochondria in the baseline state and that this is related to the activation of complex I (Laure et al., 2012): ROS production increased when the respiratory chain was fed with pyruvate/malate but not with succinate in the presence of rotenone. NADPH oxidase which is a major generator of ROS production in the cardiovascular system (Griendling et al., 2000) also contributes to the oxidative stress. The activity of the enzyme was strongly stimulated in TG mice (Fig. 2C) and this can be ascribed to an increase in the expression of the protein as demonstrated by immunoblotting (Fig 2C). Similarly, the activity of xanthine oxidase which produces hydrogen peroxide in the cell was more important in TG than in WT mice (Fig. 2D). These data reveal that Hsp22 overexpression induces oxidative stress that does not appear to be caused by a precise source of ROS but is characterized by an increased activity of all the main sources of ROS in the myocardium.

### ***3) Tempol reduced oxidative stress in TG mice***

To clarify the potential role of the observed oxidative stress in the phenotype of TG mice, mice were treated from the weaning to the adulthood with tempol (100 mg/kg/day), a membrane permeable and general antioxidant, that was shown to reduce the markers of oxidative stress in membrane, cytosol and mitochondrial compartments (Kimura et al., 2005; Mariappan et al., 2007). We observed that tempol had no effect on GSH and GSSG contents in WT mice but increased GSH (from 895±89 in control to 1124±52 in treated TG mice; p<0.05) and decreased GSSG levels in TG mice (from 489±17 in control to 427±6 in treated TG mice; p<0.05) and thus restored GSH:GSSG ratio which became similar in WT and TG mice (Fig. 2A). This change in GSH:GSSG ratio can be accounted for by the significant decrease in ROS production induced by NADPH, xanthine oxidase and by the mitochondrial respiratory chain (Fig. 2B, 2C and 2D).

### ***4) Role of oxidative stress in Hsp22-induced hypertrophy, ageing and cardioprotection.***

As oxidative stress and ROS generated by NADPH oxidase play a key role in myocardial hypertrophy (Maulik and Kumar, 2012), we first investigated the effect of tempol treatment on this parameter in 10-12 week old TG mice. We calculated the left ventricular weight over

tibial length ratio as an index of hypertrophy in control and treated WT and TG mice. Myocardial hypertrophy was significantly reduced in TG mice receiving tempol, underlying for the first time the role of oxidative stress in this model (Fig. 3A) and no effect was observed in WT mice. Previous studies had involved the regulation of Akt and highlighted an increase in Akt phosphorylation in the hypertrophic effect mediated by Hsp22 (Depre et al. 2002). We confirmed here this result and tempol highly reduced the pAkt/Akt ratio (Fig. 3B).

Then, we analyzed the ageing markers that were shown to be increased in TG mice. Figure 3C shows that both p16 and p19 mRNA levels were reduced in TG mice after tempol treatment to reach the levels found in WT mice. We also observed that tempol treatment abolished the over-mortality caused by Hsp22 overexpression, the life span of treated TG mice being similar to that of WT mice (Fig. 3D). It should be noted that tempol treatment had no effect at 30 weeks on the longevity of WT mice.

Finally, as ROS have been implicated as crucial signaling components in the protective pathways which mediate myocardial conditioning (Hausenloy and Yellon, 2007), we studied the cardioprotective effect of Hsp22 overexpression after tempol treatment. As shown in Figure 4A, Hsp22 overexpression reduced infarct size by 80 % compared to WT mice ( $p < 0.01$ ), confirming previous published data (Depre et al., 2006). A similar decrease in infarct size was observed after tempol treatment, ruling out a possible involvement of ROS production in the cardioprotective effect afforded by Hsp22 overexpression. In parallel, expression of the proteins implicated in the cardioprotective effect of Hsp22, ie iNOS, pAMPK, PKC $\epsilon$  and STAT3, were not altered (Fig. 4B).

##### ***5) Ageing did not alter the cardioprotective effect of Hsp22 overexpression.***

As (1) it is well-established that the efficacy of cardioprotective strategies decline in the aged myocardium (for reviews see Boengler et al., 2009 ; Shim, 2010) and (2) TG mice display cardiac ageing markers and have a limited life span, we investigated whether the cardioprotective effect of Hsp22 overexpression was altered in the aged myocardium. We therefore evaluated infarct size in 25-30 week old mice after ischemia reperfusion. This age was chosen because it corresponded to the mean life span of TG mice (Fig. 1A). Figure 5 shows that the reduction of infarct size was preserved in aged TG mice.



## Discussion

Hsp22 overexpression has been shown to cause cardiac hypertrophy and to provide cardioprotection that is quantitatively equivalent to that of ischemic preconditioning (Depre et al., 2006). The overexpression of Hsp22 activates most of the signaling pathways involved in cardiac cell growth and survival, including the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway, the AMPK, the PKC $\epsilon$  pathway of ischemic preconditioning, the nitric oxide pathway of delayed cardioprotection, and the mTOR pathway of cell growth (for review see Danan et al., 2007).

Our present study demonstrates that Hsp22 overexpression also leads to the development of a large oxidative stress which is mediated by the amplified activity of the most important sources of ROS production i.e., the mitochondrial respiratory chain, NADPH and xanthine oxidase. Our data demonstrate that this oxidative stress participate to the activation of these pathways and more particularly those involved in growth. Indeed, the treatment of TG mice with the general antioxidant tempol strongly inhibited ROS production and limited the development of myocardial hypertrophy underlying the role of oxidative stress in this model. Growing body of evidence reveals the causative role of redox-sensitive pathways in the processes underlying cardiac hypertrophy (Maulik and Kumar, 2012) and the antihypertrophic effect of tempol was previously described in various models of myocardial hypertrophy. For example, tempol was shown to reduce myocardial hypertrophy in insulin resistant GLUT4-knockout mice (Ritchie et al., 2007) and to prevent this process in a model of thoracic aortic constriction (Chess et al., 2008). Numerous studies have suggested a key role of ROS generated by NADPH oxidase in cardiac hypertrophy. Interestingly, the expression and activity of this enzyme are strongly increased in Hsp22 overexpressing mice and these effects are also greatly reduced by tempol. One of the signaling pathways involved in the hypertrophic effect of NADPH oxidase is Akt pathway which is also one of the main pathways implicated in Hsp22-induced hypertrophy (Depre et al., 2002). Our data show that the activation of Akt by Hsp22 is inhibited by tempol and therefore is the consequence of ROS overproduction. Taken together these data support the notion that Hsp22 overexpression is responsible for the activation of a global ROS production which stimulates Akt pathway and consequently hypertrophy.

However, the anti-hypertrophic effect of tempol was not complete and other mechanism(s) cannot be excluded. The remaining hypertrophy can be due to the fact that tempol treatment only began just after weaning (3-4 weeks) when hypertrophy was already established (Hedhli et al., 2006) suggesting that ROS inhibition is able to prevent the progression of hypertrophy

but not to reverse a process which is installed. Furthermore, the remaining hypertrophy can result from proteasome activation that has been shown to be involved to mediate Hsp22-induced hypertrophy (Hedhli *et al.*, 2006).

Our study further demonstrates that, concomitantly to the development of hypertrophy, the oxidative stress promoted by Hsp22 overexpression induces senescence markers. Indeed, heart issued from TG mice showed a massive increased in  $\beta$ -galactosidase positive cells, without modification in the telomere length, and this was accompanied by the augmentation of p16 and p19 mRNA levels which have been shown to be increased in several cardiac cell lines during ageing (Chimenti *et al.*, 2003 ; Torella *et al.*, 2004 ; Wong *et al.*, 2010 ; De Jong *et al.*, 2009). Taken together, these parameters seem to characterize a premature ageing promoted by intrinsic stresses rather than a replicative senescence process induced by telomere erosion. This supported the hypothesis that the elevated oxidative stress is also highly involved in the pathophysiological responses observed in TG mice. This is confirmed by the fact that tempol treatment prevents the increase in p16 and p19 mRNA levels.

Interestingly, Hsp22-overexpression is also associated with a high telomerase activity which is normally very low in quiescent tissue like the heart. This can also participate to the premature senescence as high telomerase activity can promote a senescence phenotype (Gorbunova *et al.*, 2003).

Conversely, our study allowed to eliminate ROS production as a possible main trigger of the cardioprotective effect promoted by Hsp22 overexpression. This is based on several arguments although (1) it is established that ROS play a signaling role during post- and preconditioning (Hausenloy and Yellon, 2007) and (2) the signaling pathways activated either by Hsp22 or preconditioning are common (Depre *et al.*, 2006). Indeed, tempol treatment did not alter the reduction in infarct size in TG mice and preserved the levels of PKC $\epsilon$ , iNOS, pAMPK and STAT3 which are considered to be responsible for this cardioprotective effect. We can conclude that this effect is not under the main control of ROS generation in this model.

It should be noted that this cardioprotection is long-lasting since it is still observed in aged TG mice (Fig. 5). This is paradoxical as our data demonstrated that Hsp22 overexpression reduced life span. This reduction is probably related to the appearance of a marked senescence phenotype and the generation of a permanent and severe oxidative stress abolished by tempol treatment.

Surprisingly, Hsp22 overexpression in *Drosophila* has been associated with increased resistance against oxidative stress and prolonged life span (Morrow et al., 2004). This opposite behavior may likely be explained by the location of Hsp22 which is only mitochondrial in *Drosophila*. It is indeed conceivable that a cytosolic source of ROS may be necessary to develop a senescent phenotype in Hsp22 overexpressing mice.

In conclusion, Hsp22 overexpression induces a potent and chronic cardioprotective effect which, contrary to other cardioprotective strategies, is maintained during aging. However, the pre-emptive activation of survival pathways by Hsp22 is associated with an oxidative stress responsible for the induction of hypertrophy and senescence and ultimately reduction in life span. This suggests that cardioprotective strategies need to be temporary to avoid the deleterious effects induced by a permanent activation of survival pathways

## References

Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1),  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Oct;44(10):1622-31

Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Jan;29(1):207-16.

Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res.* 2009 Jul 15;83(2):247-61.

Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol.* 2000 May;35(3):317-29

Chess DJ, Xu W, Khairallah R, O'Shea KM, Kop WJ, Azimzadeh AM, Stanley WC.

The antioxidant tempol attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in mice fed a high-fructose diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Dec;295(6):H2223-30

Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heleniak H, Colussi C, Di Meglio F, Nadal-Ginard B, Frustaci A, Leri A, Maseri A, Anversa P, 2003. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure, *Circ. Res.*, 93 (7), 604-613.

Danan IJ, Rashed ER, Depre C. Therapeutic potential of H11 kinase for the ischemic heart. *Cardiovasc Drug Rev.* 2007 Spring;25(1):14-29.

De Jong HJ, Woolthuis CM, de Bont ES, Huls G, 2009. Paradoxical down-regulation of p16INK4a mRNA with advancing age in acute myeloid leukemia, *Aging*, 1 (11), 949-953.

Depre, C.; Hase, M.; Gaussin, V.; Zajac, A.; Wang, L.; Hittinger, L.; Ghaleh, B.; Yu, X.; Kudej, R.K.; Wagner, T.; Sadoshima, J.; Vatner, S.F. H11 Kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo. *Circ. Res.* 2002 91: 1007-1014.

Depre C, Kim SJ, John AS, Huang Y, Rimoldi OE, Pepper JR, Dreyfus GD, Gaussin V, Pennell DJ, Vatner DE, Camici PG, Vatner SF. Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium. *Circ Res.* 2004 Aug 20;95(4):433-40

Depre, C., Wang, L., Sui, X., Qiu, H., Hong, C., Hedhli, N., Ginion, A., Shah, A., Pelat, M., Bertrand, L., Wagner, T., Gaussin, V., Vatner, S.F. H11 Kinase prevents myocardial infarction by pre-emptive preconditioning of the heart. *Circ. Res.* 98: 280-288; 2006.

Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med.* 2007 Jul-Sep;53(3):207-13.

Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Evidence that high telomerase activity may induce a senescent-like growth arrest in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):7692-8.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000 Mar 17;86(5):494-501.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2007 Nov;116(2):173-91

Hedhli N, Wang L, Wang Q, Rashed E, Tian Y, Sui X, Madura K, Depre C. Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 Kinase/Hsp22. *Cardiovasc Res.* 2008;77:497-505.

Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Suzuki T, Maeta H, Abe Y. Role of NAD(P)H oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in cardioprotection of ischemic reperfusion injury by angiotensin II. *Hypertension.* 2005;45:860-6.

Laure L, Long R, Lizano P, Zini R, Berdeaux A, Depre C, Morin D. Cardiac H11 kinase/Hsp22 stimulates oxidative phosphorylation and modulates mitochondrial reactive oxygen species production: Involvement of a nitric oxide-dependent mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jun 1-15;52(11-12):2168-76.

Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Nov;293(5):H2726-37.

Maulik SK, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicol Mech Methods.* 2012 Jun;22(5):359-66.

Morrow G, Battistini S, Zhang P, Tanguay RM. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 2004;279:43382-43385.

Pons S, Martin V, Portal L, Zini R, Morin D, Berdeaux A, Ghaleh B. Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Jan;54:82-9

Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3159-65.

Ritchie RH, Quinn JM, Cao AH, Drummond GR, Kaye DM, Favaloro JM, Proietto J, Delbridge LM. The antioxidant tempol inhibits cardiac hypertrophy in the insulin-resistant GLUT4-deficient mouse in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Jun;42(6):1119-28.

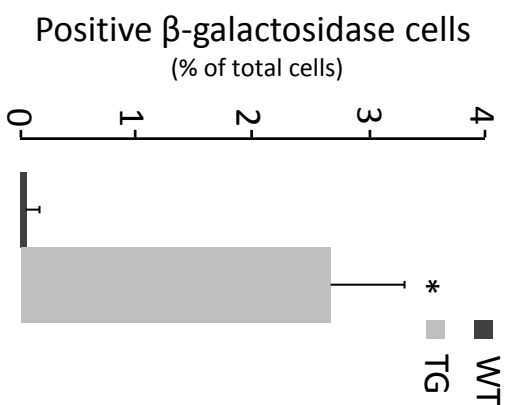
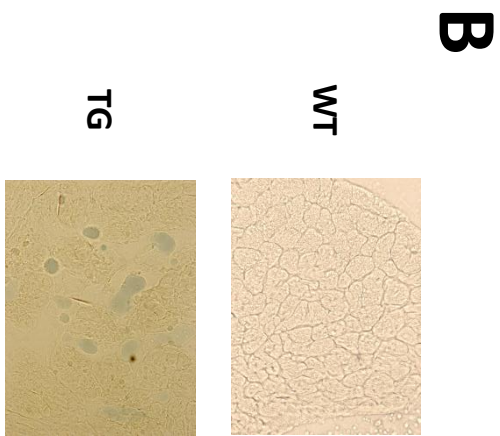
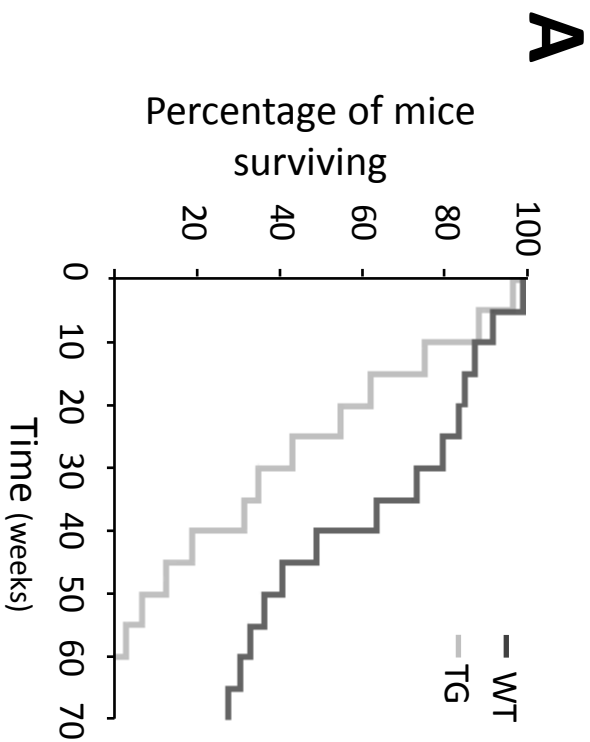
Qiu H, Lizano P, Laure L, Sui X, Rashed E, Park JY, Hong C, Gao S, Holle E, Morin D, Dhar SK, Wagner T, Berdeaux A, Tian B, Vatner SF, Depre C. H11 kinase/heat shock protein 22 deletion impairs both nuclear and mitochondrial functions of STAT3 and accelerates the transition into heart failure on cardiac overload. *Circulation.* 2011 Jul 26;124(4):406-15.

Shim YH. Cardioprotection and ageing. *Korean J Anesthesiol.* 2010 Mar;58(3):223-30

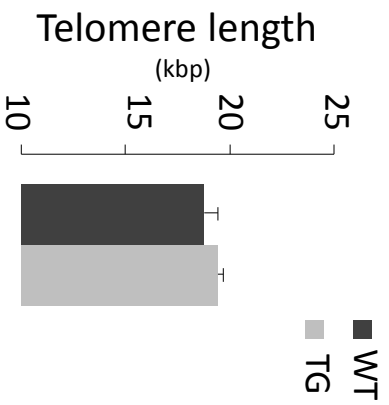
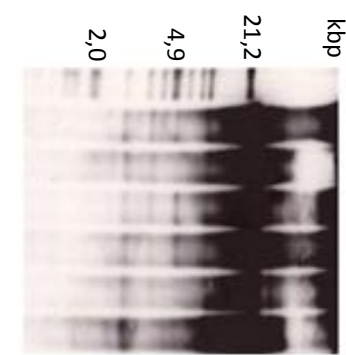
Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A, 28 2004. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression, *Circ. Res.*, 94 (4), 514-524.

Wong LS, van der Harst P, de Boer RA, Huzen J, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Aging, telomeres and heart failure. *Heart Fail Rev.* 2010 Sep;15(5):479-86

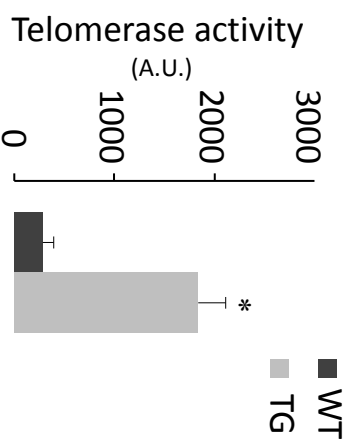
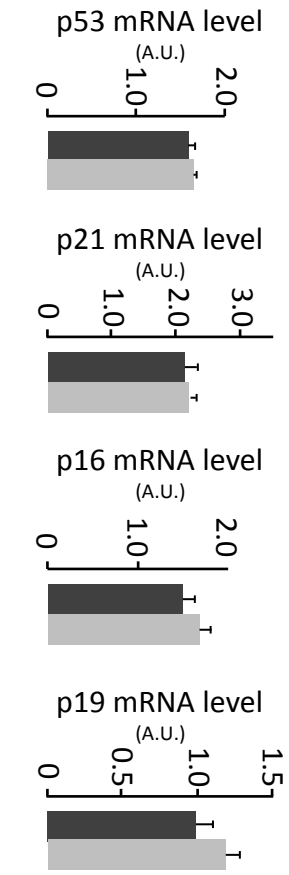
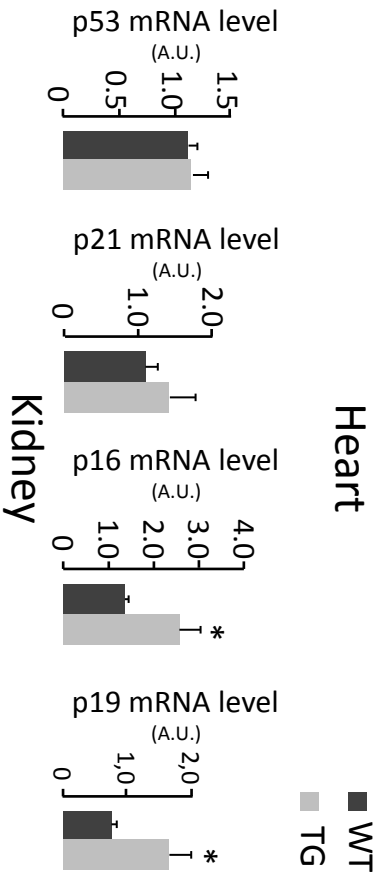
# FIGURE 1

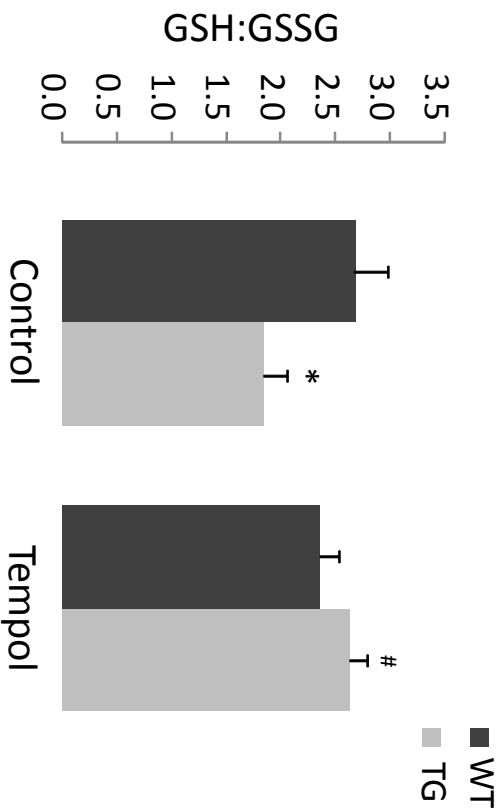
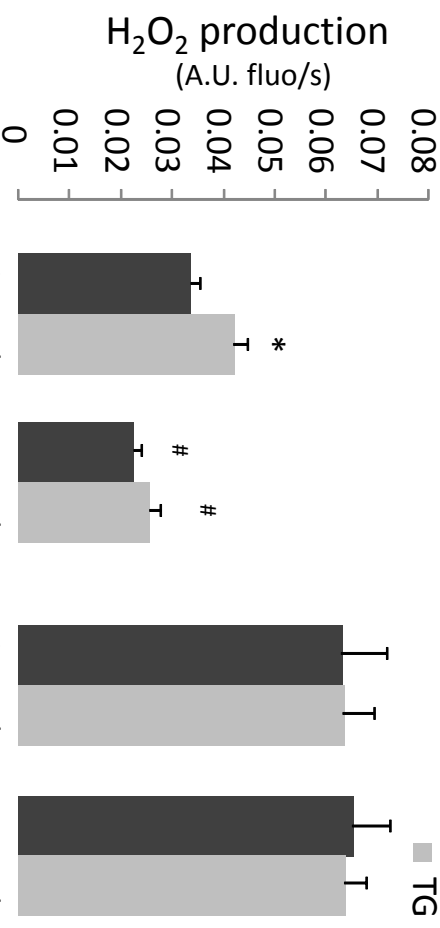
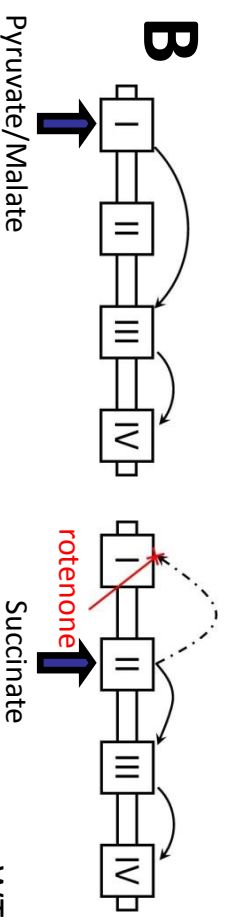
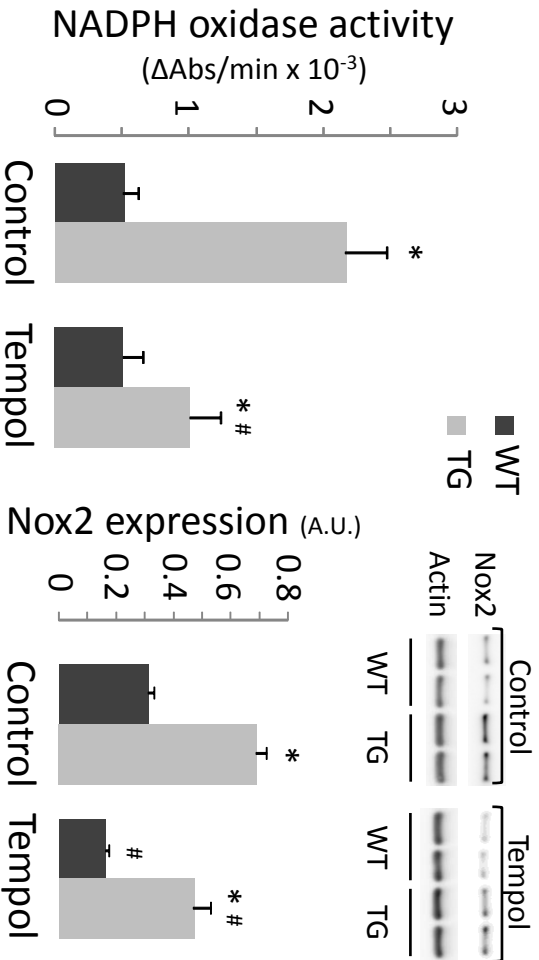
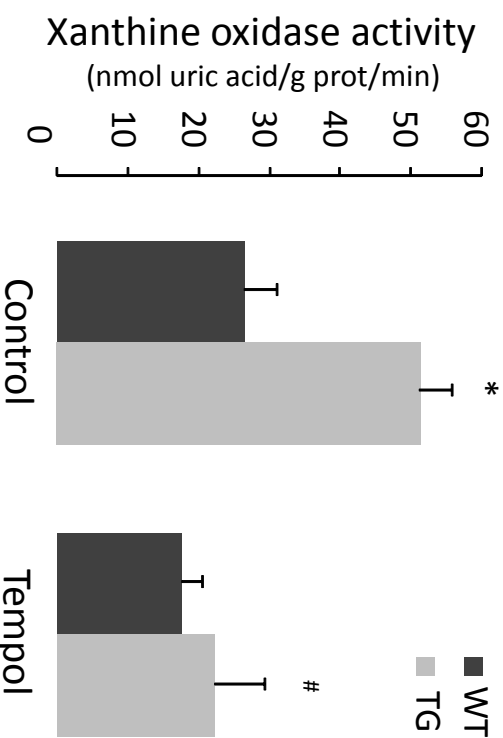


**D**



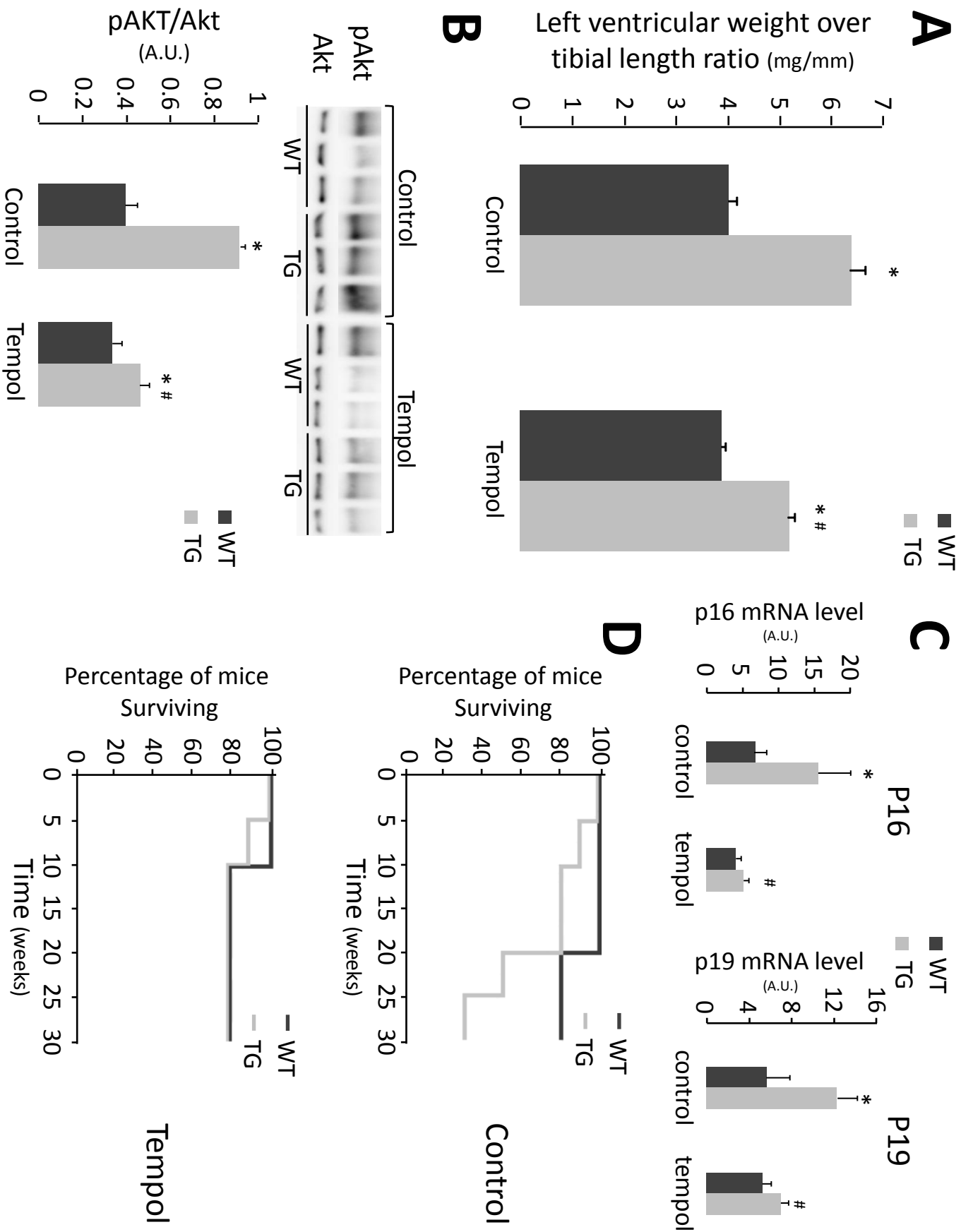
**C**



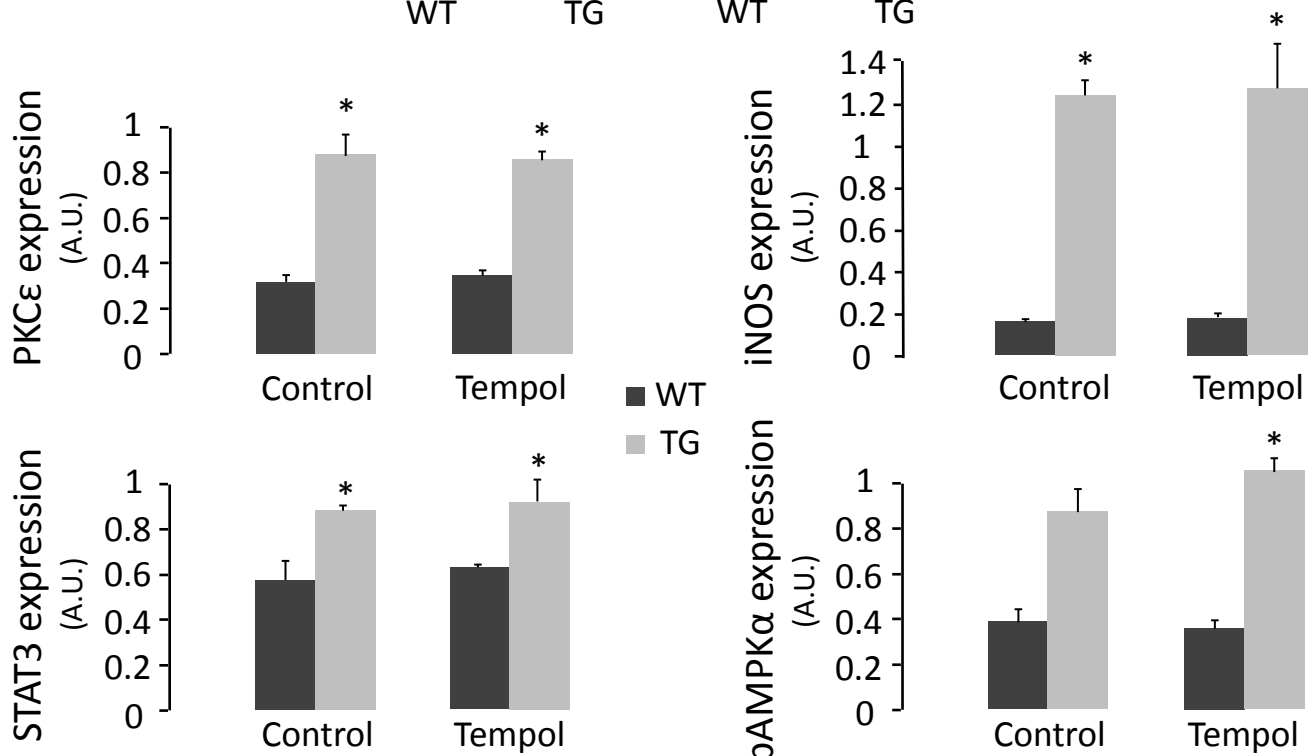
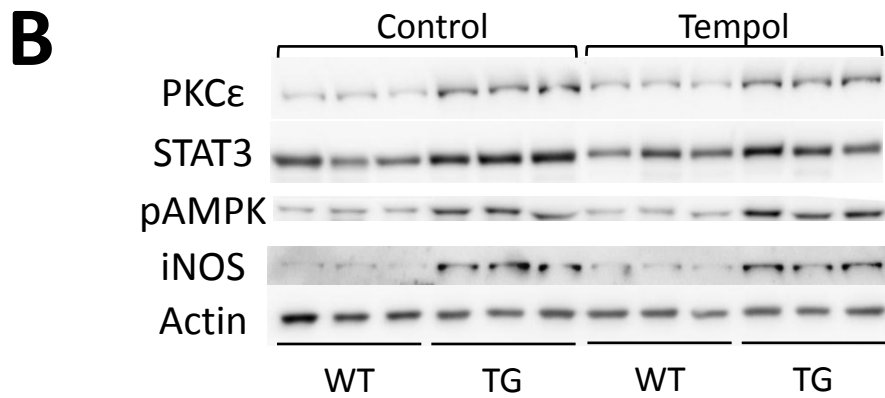
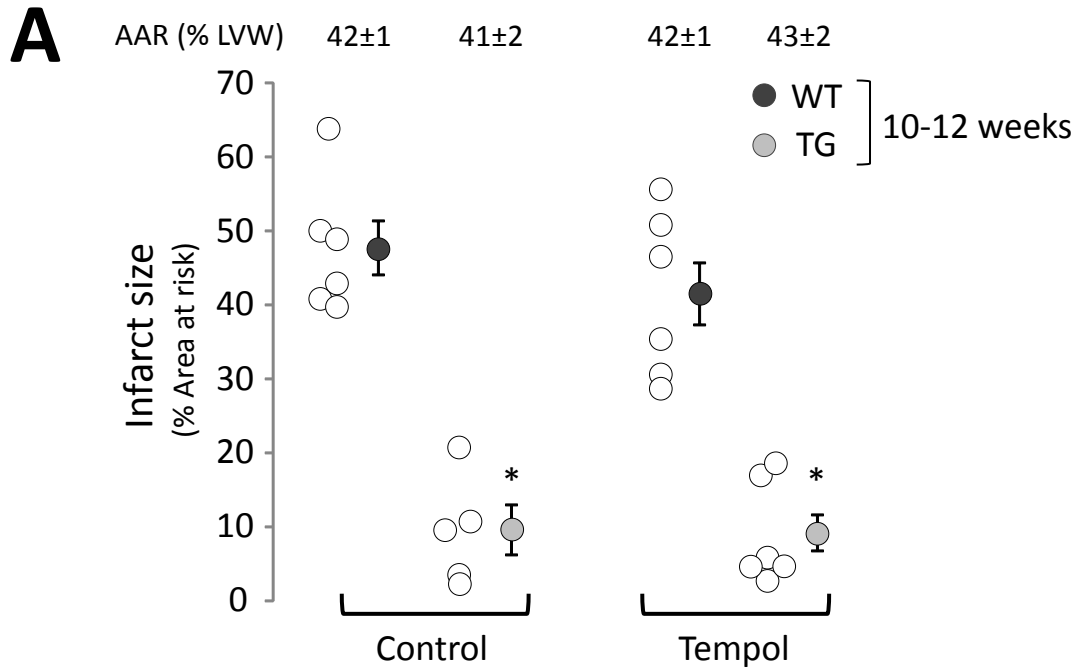
**A****B****C****D**



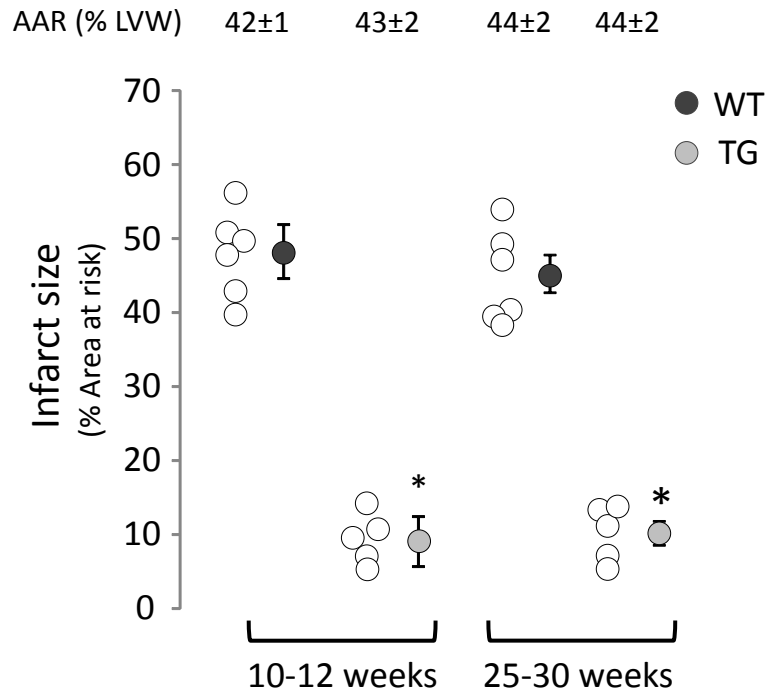
# FIGURE 3



# FIGURE 4



# FIGURE 5



**Figure 1:** Hsp22 overexpression reduces life span and promotes the appearance of myocardial markers of senescence

A: Kaplan-Meier survival curve comparing WT and TG mice (WT mice: n=93 and TG mice: n=122). Mean life spans:  $27.1 \pm 1.49$  and  $52.7 \pm 3.31$  weeks for TG and WT mice, respectively ( $p < 0.05$ ).

B: Senescence determined by measurement of  $\beta$ -galactosidase positive cells (blue coloration) in the left ventricle from WT and TG mice.

Left: Pictures from the subendocardial regions showed a positive  $\beta$ -galactosidase staining in TG mice which is absent in WT mice.

Right: Percentage of  $\beta$ -galactosidase positive cells in hearts from WT and TG mice. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six hearts.  $*p < 0.05$  vs WT.

C: Myocardial and renal mRNA levels of p53, p21, p16 and p19 were determined using quantitative RT-PCR in WT and TG mice.  $*p < 0.05$  vs WT. A.U. : arbitrary unit.

D: Telomere length was measured by southern blot after DNA digestion in heart from WT and TG mice and telomerase activity was determined in cardiac homogenates from WT and TG mice. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six independent preparations.  $*p < 0.05$  vs WT. A.U. : arbitrary unit.

**Figure 2:** Hsp22 overexpression enhances ROS production and oxidative stress in transgenic mice and these effects are abolished by tempol treatment.

Mice were treated with tempol (100mg/kg/day) or vehicle (control) from their weaning to their sacrifice.

A: GSH and GSSG contents were determined spectrophotometrically (412 nm) with 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid) in cardiac homogenates from control and treated WT and TG mice and GSH:GSSG *ratio* was calculated. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six independent preparations.  $*p < 0.05$  vs WT.  $^{\#}p < 0.05$  vs control.

B:  $H_2O_2$  production was induced by pyruvate/malate (5/5 mM) or succinate (5 mM) in the presence of rotenone (2  $\mu$ M) and was determined fluorometrically by the oxidation of Amplex red to fluorescent resorufin in isolated mitochondria from control and treated WT and TG mice. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least eight independent preparations.  $*p < 0.05$  vs WT.  $^{\#}p < 0.05$  vs respective control.

C: NADPH oxidase activity was evaluated in cardiac homogenates from control and treated WT and TG mice. NADPH oxidase expression was measured in cardiac homogenates from

control and treated WT and TG mice by western blot and was quantified relative to actin. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six independent preparations. \* $p < 0.05$  vs WT. # $p < 0.05$  vs respective control.

D: Xanthine oxidase activity was assessed by measuring the apparition of uric acid (290 nm) in cardiac homogenates from control and treated WT and TG mice. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six independent preparations. \* $p < 0.05$  vs WT. # $p < 0.05$  vs respective control.

A.U. (fluo): arbitrary units (of fluorescence)

**Figure 3:** Tempol treatment reduces myocardial hypertrophy and enhances life span in Hsp22 overexpressing mice.

Mice were treated with tempol (100mg/kg/day) or vehicle (control) from their weaning to their sacrifice.

A: Left ventricular weight over tibial length ratio in control and treated WT and TG mice. Each value represents the mean  $\pm$  sem of at least eight animals. \* $p < 0.05$  vs WT; # $p < 0.05$  vs respective control.

B: pAkt protein level was measured by western blot in cardiac homogenates from control and treated WT and TG mice and quantified relative to Akt. Pictures were quantified and each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six independent preparations. \* $p < 0.05$  vs WT; # $p < 0.05$  vs respective control. A.U.: arbitrary unit.

C: Myocardial mRNA levels of p16 and p19 were determined using quantitative RT-PCR in control and treated WT and TG mice. \* $p < 0.05$  vs WT. # $p < 0.05$  vs respective control. A.U. : arbitrary unit.

D: Mice were treated with tempol (100mg/kg/day) or vehicle from the weaning and during 6 months and survival curves for control and treated WT and TG mice were plotted (n=10 per group).

**Figure 4:** Hsp22-induced cardioprotective effect and activation of survival pathways are maintained after tempol treatment.

A: Infarct size in percentage of the area at risk (AAR) after 45min occlusion of the left anterior descending artery and 4h of reperfusion in control and tempol treated 10-12 weeks old WT and TG mice. Empty circles represent individual values and full circles the

corresponding means  $\pm$  sem. The corresponding area at risk of each group was expressed as a percentage of the left ventricular weight (LVW). \* $p < 0.05$  vs WT.

B: iNOS, PKC $\epsilon$ , AMPK and STAT3 protein levels were measured by Western Blot in WT and TG mice and quantified relative to actin except for pAMPK which was expressed as pAMPK/AMPK *ratio*. Pictures were quantified and each value represents the mean  $\pm$  sem of at least six independent preparations. \* $p < 0.05$  vs WT. A.U. : arbitrary unit.

**Figure 5:** Hsp22-induced cardioprotective effect is not altered in aged TG mice.

Infarct size in percentage of area at risk after 45min occlusion of the left anterior descending artery and 4h of reperfusion in 10-12 and 25-30 week old WT and TG mice. Empty circles represent individual values and full circles the corresponding means  $\pm$  sem. The corresponding area at risk of each group was expressed as a percentage of the left ventricular weight (LVW). \* $p < 0.05$  vs WT.

# Discussion générale

Il est clairement établi que l'une des causes majeures des lésions cellulaires myocardiques liées à l'ischémie-reperfusion est un dysfonctionnement mitochondrial et l'augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales qui en découle. Il est donc évident que l'efficacité de la plupart des stratégies cardioprotectrices est conditionnée par leur capacité à protéger ou rétablir la fonction de ces organites et à limiter l'augmentation de perméabilité de leurs membranes lors de la reperfusion. Une nouvelle stratégie cardioprotectrice consistant à sur-exprimer la protéine Hsp22 spécifiquement dans le myocarde a été décrite par l'équipe du Dr Depré (Depre *et al.*, 2006a) qui s'est appliquée à analyser les mécanismes cellulaires impliqués dans cet effet (Chen *et al.*, 2011 ; Qiu *et al.*, 2011). La protéine Hsp22 est en effet capable de protéger le myocarde des lésions de l'ischémie-reperfusion avec une efficacité équivalente à la stratégie de référence : le pré-conditionnement ischémique. La similitude s'étend également aux mécanismes moléculaires mis en jeu par ces deux stratégies. En effet, la protéine Hsp22 active les mêmes voies de survie que celles impliquées dans le PCI, notamment les voies RISK et JAK/STAT, qui aboutissent à un même effecteur final : la mitochondrie. La première étape de notre travail a donc été d'étudier le rôle de la mitochondrie dans l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22 et dans cette première partie nous avons montré que la mitochondrie participe effectivement à l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22.

## **1 Rôle de la mitochondrie dans l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22**

Les premiers travaux analysant l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22 ont mis en évidence un rôle important du NO. En effet, un traitement par un inhibiteur des NOS supprime l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22 après ischémie-reperfusion dans un modèle porcin et Hsp22 augmente l'expression de iNOS par des voies dépendantes de STAT3 et NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2011). Plus généralement, le rôle des NOS dans la fenêtre tardive du PCI et l'activation de iNOS par NF- $\kappa$ B et la voie JAK/STAT ont été décrits dans de nombreuses études (Bolli, 2001). Si les mécanismes par lesquels le NO exerce son effet cardioprotecteur ne sont pas encore totalement élucidés, un rôle au moins partiel de la mitochondrie a été

mis en évidence. En effet, les donneurs de NO facilitent l'ouverture des canaux mitoK<sub>ATP</sub> induite par le diazoxide et sont capables d'activer partiellement ce canal par eux-mêmes (Sasaki *et al.*, 2000). Cependant, l'utilisation d'antagonistes du mitoK<sub>ATP</sub> ne prévient pas l'effet cardioprotecteur du NO chez le lapin ce qui suggère que ce mécanisme n'est pas primordial dans l'effet cardioprotecteur induit par le NO ou qu'il dépend de l'espèce (Takano *et al.*, 2000).

Nos résultats montrent que la sur-expression de la protéine Hsp22 induit une adaptation de la fonction respiratoire mitochondriale par un mécanisme dépendant du NO (Laure *et al.*, 2012). En effet, elle augmente la synthèse mitochondriale de NO qui stimule à son tour la phosphorylation oxydative. Cet effet est aboli à la fois par un prétraitement des animaux par un inhibiteur des NOS et par l'utilisation *in vitro*, sur les mitochondries isolées, d'un piègeur de NO. Ce résultat indique que le NO produit par les NOS au niveau de la mitochondrie est responsable de cet effet. Or le NO est classiquement décrit comme un inhibiteur, et non comme un activateur de la chaîne respiratoire, soit par compétition directe avec l'O<sub>2</sub> au niveau du complexe IV (Brown et Cooper, 1994), soit par S-nitrosations au niveau des différents complexes respiratoires (Brown et Borutaite, 2004). Cet effet paradoxal que nous observons ne peut donc pas être lié aux effets classiquement décrits du NO au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. De façon intéressante, notre équipe en collaboration avec celle du Dr Depré a récemment mis en évidence que la protéine Hsp22 co-précipite avec STAT3 et l'active au niveau de la mitochondrie (Qiu *et al.*, 2011). Comme il a été montré que STAT3 active la phosphorylation oxydative (Wegrzyn *et al.*, 2009), il est possible que l'effet activateur du NO sur la chaîne respiratoire soit lié à l'activation de STAT3 au niveau mitochondrial. En revanche, dans le modèle de mitochondries isolées soumises à une hypoxie-réoxygénation, le NO exerce bien un effet inhibiteur sur la chaîne respiratoire mitochondriale chez les souris TG. On observe en effet une diminution accrue de la phosphorylation oxydative chez ces animaux, diminution qui est dépendante du NO puisqu'inhibée par un inhibiteur des NOS. Cette chute de la phosphorylation oxydative est probablement due à la baisse de la concentration en O<sub>2</sub> lors de la phase d'hypoxie qui permet au NO d'exercer son effet inhibiteur ce qui ralentit la reprise de l'activité respiratoire et permet de limiter la production d'ERO lors de la réoxygénation. Après ischémie-reperfusion sur animal entier, une inhibition limitée de la phosphorylation oxydative persiste chez les souris TG (sans atteinte du coefficient respiratoire) tandis que l'on constate une



altération de la fonction respiratoire mitochondriale (avec atteinte du coefficient respiratoire) chez les souris WT. La persistance d'une inhibition chez les souris TG après 15 min de reperfusion pourrait s'expliquer par la réversion lente de l'inhibition de la chaîne respiratoire par le NO chez les souris TG. Il est intéressant de noter que l'inhibition réversible de la chaîne respiratoire par du nitrite est capable de protéger le myocarde via des S-nitrosations du complexe I (Shiva et Gladwin, 2009). Cependant l'absence d'altération de l'activité du complexe I en absence de stress ischémique semble exclure un tel mécanisme d'action chez la souris Hsp22 même s'il faudrait vérifier cette hypothèse en étudiant l'activité de ce complexe après ischémie-reperfusion.

Nos résultats sur la fonction mitochondriale nous ont également permis de mettre en évidence un effet jusqu'alors non décrit du NO à savoir : l'inhibition du retour des électrons du complexe II vers le complexe I. En effet, nous avons montré une inhibition de la production d' $H_2O_2$  induite par le retour électronique à l'état de base chez les souris TG. Cet effet est aboli par un prétraitement des animaux par le L-NAME qui inhibe les NOS et donc la production de NO soulignant un rôle majeur du NO dans ce phénomène. Ceci a été confirmé par l'utilisation d'un donneur de NO, le NONOate, qui inhibe également le retour des électrons du complexe II vers le complexe I de façon concentration-dépendante et à des concentrations qui n'altèrent pas le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cet effet pourrait être lié à des modifications de la structure du complexe I par le NO telles que des S-nitrosations qui ont déjà été décrites pour ce complexe (Brown et Borutaite, 2004). Il est intéressant de noter que nous avons observé des effets similaires avec un autre gazotransmetteur : le CO. En effet, l'utilisation d'un donneur de CO, le CORM-3 (pour CO-releasing molecule 3) nous a permis de montrer que le CO exerce aussi une inhibition concentration-dépendante du retour des électrons du complexe II vers le complexe I (données non publiées). Le mécanisme d'inhibition du retour des électrons par le CO est probablement différent de celui du NO et pourrait faire intervenir l'effet découplant du CO (Lo Iacono *et al.*, 2011), le retour des électrons étant sensible au potentiel de membrane mitochondrial. Cependant il n'est pas exclu que ces deux gazotransmetteurs puissent posséder une cible d'action commune au niveau du complexe I.

Cette diminution de production d'ERO causée par l'inhibition du retour des électrons pourrait participer à l'effet cardioprotecteur observé chez les TG. En effet, lors de l'ischémie,

on observe des modifications des concentrations relatives des différents substrats de la chaîne respiratoire mitochondriale, notamment une augmentation du succinate (Folbergrova *et al.*, 1974) qui pourrait favoriser le phénomène de retour des électrons du complexe II vers le complexe I et participer à la forte production d'ERO à la reperfusion. L'inhibition de ce phénomène serait plutôt bénéfique, d'autant plus qu'il semble inversement corrélé à l'espérance de vie chez les mammifères (Lambert *et al.*, 2007). Des résultats récents suggèrent cependant qu'il est peu probable que la production d'ERO par le retour des électrons du complexe II vers le complexe I de la chaîne respiratoire joue un rôle prépondérant dans les lésions liées à la reperfusion (Ross *et al.*, 2013).

En résumé, la sur-expression de la protéine Hsp22 réduit la production d'ERO induite par le retour électronique ainsi que la capacité maximale de production d'ERO par les complexes I et III à l'état de base. Après un stress hypoxique, la sur-expression de la protéine Hsp22 inhibe la phosphorylation oxydative et cet effet est associé à une diminution de la production d'ERO par les complexes I et III. L'inhibition de la production des ERO au moment de la reperfusion permet de limiter l'ouverture du mPTP et de réduire l'altération des mitochondries. L'ouverture du mPTP est l'un des événements clés menant à la mort cellulaire et la plupart des stratégies cardioprotectrices aboutissent à l'inhibition de cette ouverture. De façon intéressante, le blocage transitoire de la chaîne respiratoire pendant l'ischémie ou à la reperfusion est l'un des mécanismes permettant de limiter l'ouverture du mPTP en réduisant la production d'ERO, comme cela a été démontré avec l'amobarbital, un inhibiteur du complexe I (Chen *et al.*, 2006). Chez les souris TG la sensibilité d'ouverture du mPTP au  $Ca^{2+}$  est réduite à l'état de base et la sur-expression d'Hsp22 limite l'ouverture du mPTP après ischémie-reperfusion ce qui d'une part confirme l'effet protecteur de la protéine Hsp22 au niveau mitochondrial et d'autre part rappelle les effets de l'amobarbital. Ceci suggère que l'effet cardioprotecteur de la protéine Hsp22 pourrait en partie découler de l'inhibition réversible de la phosphorylation oxydative à la reperfusion.

Dans leur ensemble nos résultats montrent donc que l'effet cardioprotecteur induit par la sur-expression de la protéine Hsp22 fait intervenir une adaptation des fonctions mitochondriales. La protéine Hsp22 augmente la production de NO au niveau mitochondrial ce qui limite la production d'ERO par la chaîne respiratoire et limite l'ouverture du mPTP au moment de la reperfusion aboutissant à une protection de la fonction mitochondriale, un profil d'action similaire à celui du PCI.

Il convient de noter que si le NO est nécessaire et suffisant pour induire un effet cardioprotecteur lors de la phase tardive du PCI, l'utilisation de donneurs de NO a révélé des effets assez limités (Vitale *et al.*, 2008). Il est probable que la stimulation de la production de NO dans les cardiomyocytes est plus efficace que l'apport de NO par la voie endothéliale. Ceci se vérifie dans le cas de la sur-expression de Hsp22 qui active la production mitochondriale de NO ce qui permet à la fois d'augmenter sa concentration au niveau de ses cibles tout en limitant une surproduction excessive qui pourrait s'avérer délétère.

## **2 Rôle du stress oxydant dans les effets induits par Hsp22**

L'intérêt de la sur-expression de la protéine Hsp22 en tant que stratégie cardioprotectrice repose sur son indépendance vis-à-vis d'un stimulus ischémique préalable, à l'inverse du pré- ou du post-conditionnement, ce qui permet d'envisager une application prophylactique difficilement envisageable avec les techniques de conditionnement. L'utilisation d'Hsp22 pour activer les voies de survie impliquées dans les processus de cardioprotection représente donc une stratégie thérapeutique potentiellement intéressante et originale pour les patients à risque. Cependant, nous nous sommes rapidement rendu compte que les souris sur-exprimant la protéine Hsp22 mourraient précocement par rapport aux souris WT. Une étude de longévité a confirmé cette intuition et a mis en évidence une forte réduction de l'espérance de vie des souris TG. Cet effet s'accompagne de l'apparition précoce de marqueurs de sénescence au niveau cardiaque dès le jeune âge chez les souris TG (10-12 semaines). En effet, les cœurs de souris TG présentent plus de cellules positives pour la  $\beta$ -galactosidase qui est un marqueur de sénescence. Nous avons également observé une augmentation au niveau des ARNm des protéines p16 et p19 dont l'expression augmente avec le vieillissement dans plusieurs lignées de cellules cardiaques avec le vieillissement (Chimenti *et al.*, 2003 ; Wong *et al.*, 2010). En revanche, la longueur des télomères n'est pas modifiée chez les souris TG. L'ensemble de ces résultats semblent impliquer une sénescence qui serait plutôt la conséquence d'un stress intrinsèque plutôt qu'une sénescence répliquative liée à l'érosion des télomères. L'augmentation de l'activité de la télomérase constatée chez les souris TG appuie cette hypothèse puisqu'elle est liée au stress oxydant dans différents modèles (Lopez-Diazguerrero *et al.*, 2012 ; Maeda *et al.*, 2013). La télomérase est une enzyme qui synthétise les répétitions spécifiques de séquences

d'ADN qui forment le télomère et elle est très peu exprimée à l'état adulte dans le myocarde. L'augmentation de son expression est liée à l'apparition d'un phénotype sénescence dans les fibroblastes (Gorbunova *et al.*, 2003) ce qui pourrait participer à l'apparition du phénotype sénescence dans le myocarde des souris TG. Paradoxalement, l'activation de la télomérase a également été décrite comme un mécanisme protecteur dans les phénomènes de sénescence induite par le stress oxydant (Shen *et al.*, 2013 ; Tichon *et al.*, 2013).

Notre étude a donc permis de montrer qu'une sur-expression de la protéine Hsp22 permet d'obtenir un effet cardioprotecteur puissant et « chronique » mais cette efficacité s'accompagne d'autres effets délétères non négligeables comme une hypertrophie myocardique déjà décrite (Depre *et al.*, 2002) et surtout une réduction importante de la durée de vie des animaux (Long *et al.*, manuscrit soumis). La question qui s'est posée à nous est la suivante : comment une puissante cardioprotection peut-elle s'accompagner d'une importante réduction de la durée de vie et quel(s) mécanisme(s) pourrai(en)t être impliqué(s) dans cet effet qui peut paraître paradoxal ?

L'étude de la fonction mitochondriale chez la souris sur-exprimant Hsp22 a mis en évidence des modifications majeures de la production d'ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, la respiration mitochondriale basale utilisant le pyruvate/malate comme substrat produit plus d'ERO chez les souris Hsp22 que chez les souris WT. De nombreux travaux ayant fortement impliqué le stress oxydant dans l'hypertrophie (Maulik et Kumar, 2012), dans le vieillissement des organismes et donc sur la durée de vie (Vina *et al.*, 2007) ainsi que dans l'effet cardioprotecteur du PCI (Hausenloy et Yellon, 2007), nous nous sommes demandés s'il ne pouvait pas expliquer aussi les résultats observés chez la souris TG. Nos résultats ont montré que la sur-expression de la protéine Hsp22 induit une augmentation généralisée de la production d'ERO responsable d'un stress oxydant. La protéine Hsp22 est en effet capable de stimuler les sources cellulaires prépondérantes de production d'ERO *i.e.* la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du complexe I, la NADPH oxydase et la xanthine oxydase. De nombreuses études ont démontré l'existence d'une régulation entre les différentes sources d'ERO cellulaires qui peuvent s'activer entre elles et entraîner ainsi l'apparition d'un cercle vicieux autoentretenu qui amplifie la production d'ERO (Dikalov, 2011). Ainsi dans un modèle *in vitro*, le traitement par l'angiotensine II de cellules endothéliales induit une activation rapide des NADPH oxydases

(Doughan *et al.*, 2008). Les ERO produits par les NADPH oxydases activent alors la production d'ERO mitochondriale *via* l'activation du mitoK<sub>ATP</sub>. Cette idée est renforcée par le fait que l'inhibition des NADPH oxydases par l'apocynine prévient l'altération mitochondriale dans ce modèle (Doughan *et al.*, 2008). De la même manière, le traitement par l'angiotensine II n'a plus d'effet sur l'activité de la NADPH oxydase dans une lignée cellulaire présentant une sur-expression de la SOD mitochondriale. De façon intéressante, l'invalidation de cette SOD potentialise les effets de l'angiotensine II sur l'activité des NADPH oxydases (Dikalova *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation des NADPH oxydases augmenterait la génération d'ERO mitochondriaux et *vice versa*. L'action d'Hsp22 peut donc être liée à l'activation simultanée de différentes sources d'ERO mais il est aussi possible qu'Hsp22 n'active qu'une source d'ERO qui à son tour stimule la production d'ERO par d'autres sources entraînant la mise en place d'une génération d'ERO globale (figure 23).

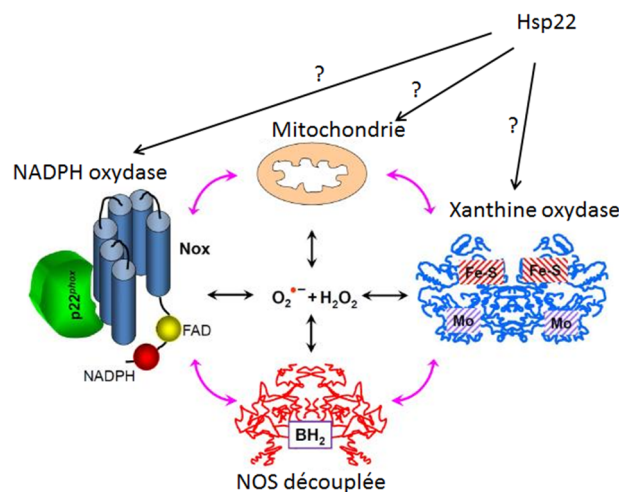


Figure 29 : Interaction entre les différentes sources d'ERO et rôle de la protéine Hsp22. La production d'ERO quelle que soit la source peut activer la NADPH oxydase, la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, la stimulation de la production d'ERO mitochondriale ou le découplage de la NOS. La sur-expression de la protéine Hsp22 active la production d'ERO par les 3 premières sources citées ci-dessus mais cette activation peut aussi résulter de l'activation simultanée des 3 ou d'une seule qui stimulerait alors les 2 autres.

Le traitement par le tempol ne permet pas de distinguer si l'une des sources est prépondérante. Des traitements antioxydants ciblés pourraient peut-être permettre de caractériser plus finement le rôle des ERO dans le modèle TG. Ainsi, un traitement

antioxydant ciblé au niveau de la mitochondrie (utilisant par exemple un mime de SOD mitochondriale, le MnTBAP) pourrait être envisagé et permettre de distinguer si la chaîne respiratoire mitochondriale est la source d'ERO prédominante ou si c'est plutôt une conséquence de l'activation d'une autre source.

Cette augmentation généralisée de production d'ERO dans le myocarde chez les souris TG s'accompagne d'une augmentation du rapport GSSG : GSH, qui est un marqueur du stress oxydant. Dès le stade jeune adulte (10-12 semaines), la souris sur-exprimant Hsp22 est donc soumise à un stress oxydant myocardique puissant qui pourrait jouer un rôle dans le développement de l'hypertrophie, dans l'effet cardioprotecteur et aussi dans la réduction de la durée de vie. Afin d'étudier le rôle de cette surproduction d'ERO dans les différents effets de la protéine Hsp22, nous avons opté pour l'administration préventive et continue d'un traitement antioxydant. Notre choix s'est porté sur le tempol, un nitroxyde qui favorise le métabolisme de plusieurs ERO et qui a été utilisé dans de nombreux modèles de stress oxydant (Wilcox, 2010). Il notamment été utilisé dans un modèle murin de souris invalidé pour le transporteur au glucose GLUT4 dans le myocarde chez lequel il inhibe l'hypertrophie (Ritchie *et al.*, 2007). Nous l'avons choisi car il présente de nombreux avantages : il a la particularité d'être stable, soluble dans l'eau, perméable aux membranes, de faible toxicité, lipophile et considéré comme étant non-immunogène. Le tempol est un mime SOD qui réagit très rapidement avec  $O_2^{\cdot -}$  (entre  $1,1 \times 10^3$  à  $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  à pH=7). Il présente également des propriétés de type catalase et prévient la formation  $\cdot OH$  à partir d' $H_2O_2$  par la réaction de Fenton, il est donc plutôt considéré comme un antioxydant général.

L'administration de tempol par voie orale, depuis le sevrage jusqu'au moment du sacrifice, a permis d'inhiber la surproduction d'ERO causée par l'activation des 3 différentes sources cellulaires étudiées ainsi que le stress oxydant chez les souris TG, confirmant ainsi l'efficacité de ce traitement antioxydant pour analyser le rôle des ERO chez ces souris. Nos résultats ont montré que le traitement par le tempol permettait de réduire en partie l'hypertrophie myocardique chez les souris TG comparé aux souris TG non traitées. Des études précédentes ayant souligné le rôle de l'activation d'Akt dans l'effet hypertrophique d'Hsp22 (Depre *et al.*, 2002), nous avons pu vérifier ce résultat en montrant que le traitement tempol limitait fortement l'activation par phosphorylation d'Akt chez les souris TG. Cependant, l'effet de ce traitement sur l'hypertrophie ainsi que sur l'activation d'Akt

n'est pas total. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. La première est que le traitement des animaux ne commence qu'au moment du sevrage, 3-4 semaines après la naissance, âge où les souris TG présentent déjà une hypertrophie marquée (Hedhli *et al.*, 2008). Ceci sous-entend que le traitement par le tempol préviendrait l'hypertrophie résultant du stress oxydant mais ne permettrait pas d'abolir une hypertrophie déjà existante. L'administration du tempol dès la naissance ou à un âge plus tardif, pour vérifier dans le premier cas si la diminution de l'hypertrophie est plus importante ou dans le second si elle est moindre, permettrait d'approfondir cette hypothèse. La deuxième explication à cette hypertrophie résiduelle est l'existence d'autres mécanismes indépendants des ERO par lesquelles Hsp22 induit l'hypertrophie. Hedhli *et al.* (2008) ont ainsi montré que l'activation du protéasome par Hsp22 joue un rôle dans l'hypertrophie induite par Hsp22. La combinaison d'un traitement tempol et d'un inhibiteur de l'activation du protéasome permettrait d'étudier l'indépendance de ces 2 mécanismes dans l'hypertrophie induite par Hsp22.

La seconde étape de l'étude a consisté à étudier les effets du stress oxydant sur le vieillissement induit par la sur-expression de la protéine Hsp22. Un traitement quotidien de longue durée des animaux par le tempol a donc été mis en place dès le sevrage chez des souris WT et TG et la survie des animaux a été mesurée. Après 25 semaines de traitement, nous avons montré que la durée de vie des souris TG était similaire à celle des souris WT ce qui confirme que le stress oxydant est bien responsable de la mortalité accrue des souris TG. Cette restauration de l'espérance de vie chez les souris TG traitées s'accompagne d'une réduction de l'expression des protéines p16 et p19 chez les souris TG jeunes adultes ce qui confirme que l'apparition d'un phénotype sénescence dans les cœurs de souris TG est la conséquence d'un stress oxydant chronique. L'augmentation de l'activité de la télomérase chez les souris TG pourrait donc être un mécanisme de défense contre ce stress oxydant qui permettrait de préserver l'intégrité des télomères sans empêcher l'apparition de marqueurs de sénescence. Cette idée est renforcée par la démonstration que l'augmentation de l'activité de la télomérase protège les cellules de la mort par apoptose et nécrose mais pas de l'apparition d'une sénescence prématurée dans un modèle *in vitro* de stress oxydant sur des fibroblastes humains (Gorbunova *et al.*, 2002). Cependant, le lien entre le vieillissement prématuré du myocarde et la mort prématurée de l'animal reste à préciser car l'origine

exacte de la mortalité accélérée des souris TG non traitées par le tempol n'est pas connue (même si l'on peut fortement impliquer l'hypertrophie cardiaque). Dans ce contexte, il paraît intéressant de souligner que le stress oxydant (Tsutsui *et al.*, 2011) et le vieillissement (Fyhrquist *et al.*, 2013) ont également été impliqués dans le développement de l'insuffisance cardiaque, qui pourrait être la cause principale de la réduction de la durée de vie mise en évidence chez les souris TG. Il faut toutefois préciser que c'est plutôt une sénescence répllicative, avec un raccourcissement des télomères qui est évoquée dans le cadre de la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque. Si l'apparition de marqueurs de sénescence est probablement la conséquence directe du stress oxydant, son rôle dans l'évolution phénotypique du modèle de souris sur-exprimant Hsp22 au cours du temps reste à ce jour inexploré.

De façon surprenante, la sur-expression de la protéine Hsp22 chez la drosophile est associée à une augmentation de la durée de vie et à une résistance accrue au stress oxydant (Morrow *et al.*, 2004b). A l'inverse, l'inactivation de ce gène réduit la durée de vie et accroît la sensibilité au stress (Morrow *et al.*, 2004a). Ce comportement diamétralement opposé à la souris TG pourrait être lié à la localisation exclusivement mitochondriale de la protéine Hsp22 chez la drosophile, ce qui semblerait indiquer que c'est plutôt la forme cytosolique de Hsp22 qui serait responsable du stress oxydant et des effets délétères de cette protéine alors que la forme mitochondriale serait plutôt protectrice. Encore une fois, l'utilisation d'un mime de SOD mitochondriale pourrait permettre d'étudier la contribution relative de chacune des sources d'ERO dans les effets délétères de la sur-expression de la protéine Hsp22.

Comme le rôle des ERO dans l'effet cardioprotecteur induit par le PCI a clairement été établi et que la protéine Hsp22 active les mêmes voies de signalisation que le PCI, nous avons étudié le rôle des ERO dans l'effet cardioprotecteur induit par la protéine Hsp22. Nos résultats ont permis d'exclure un quelconque rôle des ERO dans l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22. En effet, après traitement par le tempol, la taille de l'infarctus n'est pas modifiée chez les souris TG. Il faut noter que le traitement par le tempol n'a pas non plus d'effet chez les souris WT alors qu'on aurait pu s'attendre à un effet cardioprotecteur. En effet, plusieurs traitements antioxydants ont montré des effets cardioprotecteurs dans différents modèles d'ischémie-reperfusion. Ainsi un traitement par le tempol est capable de



réduire la taille de l'infarctus chez le lapin et le rat (McDonald *et al.*, 1999). Cependant dans cette étude, le tempol était administré sous forme d'un bolus (100 mg/kg) 5 min avant la reperfusion puis d'une perfusion (30 mg/kg) pendant toute la durée de la reperfusion. Dans notre étude le tempol était administré quotidiennement avec la dernière administration la veille de la chirurgie, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet marqué dans notre étude.

La persistance de l'effet cardioprotecteur chez les souris TG traitées par le tempol s'accompagne du maintien de l'activation des différentes voies impliquées dans l'effet cardioprotecteur d'Hsp22. Ainsi les protéines STAT3, AMPK $\alpha$ , iNOS et PKC $\epsilon$  restent toutes activées après traitement par le tempol ce qui tendrait à montrer que la surproduction d'ERO n'est pas responsable de leur activation chez la souris TG. Notre étude a également mis en évidence que l'effet cardioprotecteur induit par Hsp22 persistait à un âge avancé. Si différentes stratégies cardioprotectrices ont montré une perte d'efficacité avec l'âge (Boengler *et al.*, 2009), la sur-expression de la protéine Hsp22 conserve son effet cardioprotecteur à un âge où les cœurs de souris TG expriment des marqueurs de sénescence et pour lequel plus de la moitié des souris TG sont mortes.

L'ensemble de nos résultats montrent toutes les limites d'une activation chronique des voies de cardioprotection par la protéine Hsp22. Si cela permet d'obtenir un effet cardioprotecteur puissant et durable, contrairement aux autres stratégies cardioprotectrices ponctuelles qui perdent en efficacité avec l'âge, cela s'accompagne en parallèle d'une génération accrue d'ERO par différentes sources cellulaires qui induit un stress oxydant myocardique chronique et délétère. Ce stress oxydant est en effet responsable du développement d'une hypertrophie myocardique précoce, de l'apparition d'un phénotype sénéscent dans le cœur et aboutit *in fine* à une réduction importante de la durée de vie des souris. Il faut cependant souligner l'efficacité du traitement antioxydant qui, associé à l'activation chronique d'Hsp22, limite fortement ses effets délétères puisqu'il rétablit l'espérance de vie, inhibe le vieillissement prématuré du myocarde ainsi que l'hypertrophie myocardique.

De façon intéressante, Hsp22 n'est pas la seule sHsp à jouer un rôle à la fois dans la balance redox de la cellule, dans les processus cardioprotecteurs et dans le développement de l'hypertrophie. Ainsi la souris sur-exprimant spécifiquement Hsp20 dans le myocarde est moins sensible aux lésions liées à l'ischémie-reperfusion (Fan *et al.*, 2005). De la même façon

la sur-expression d'Hsp27 dans le myocarde induit un puissant effet cardioprotecteur (Hollander *et al.*, 2004) et une cardiomyopathie liée à un stress réducteur par l'activation de la GPx (Zhang *et al.*, 2010). Il faut également souligner que la sur-expression de la protéine Hsp22 induit une augmentation de l'expression de la protéine Hsp27 et il a été montré que ces 2 protéines interagissaient directement (Depre *et al.*, 2006a). Il serait intéressant d'étudier l'expression d'Hsp22 chez la souris sur-exprimant Hsp27 ou Hsp20. Les sHsp pourraient donc agir de concert, interagissant ensemble et s'activant l'une l'autre, pour activer les différentes voies de la cardioprotection et obtenir un effet pléiotrope. En revanche, cette activation chronique des voies de survie par les sHsp s'accompagnerait d'effets délétères qui aboutiraient à la mort prématurée.

# Références bibliographiques

- Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP and Sammut IA (2005). "Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury." *FASEB J* 19: 1088-1095.
- Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R and Komuro I (2001). "Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy." *Biochem Biophys Res Commun* 289: 901-907.
- Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* 357: 593-615.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D and Ovize M (2005). "Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury." *J Mol Cell Cardiol* 38: 367-374.
- Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA and Schagger H (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *EMBO J* 17: 7170-7178.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S and Murad F (1977). "Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3203-3207.
- Assaly R, de Tassigny A, Paradis S, Jacquin S, Berdeaux A and Morin D (2012). "Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia-reoxygenation in adult cardiomyocytes." *Eur J Pharmacol* 675: 6-14.
- Aurelian L, Smith CC, Winchurch R, Kulka M, Gyotoku T, Zaccaro L, Chrest FJ and Burnett JW (2001). "A novel gene expressed in human keratinocytes with long-term in vitro growth potential is required for cell growth." *J Invest Dermatol* 116: 286-295.
- Aurelian L, Laing JM and Lee KS (2012). "H11/HspB8 and Its Herpes Simplex Virus Type 2 Homologue ICP10PK Share Functions That Regulate Cell Life/Death Decisions and Human Disease." *Autoimmune Dis* 2012: 395329.
- Babcock GT and Wikstrom M (1992). "Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration." *Nature* 356: 301-309.
- Baines CP, Goto M and Downey JM (1997). "Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 29: 207-216.
- Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM and Ping P (2003). "Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria." *Circ Res* 92: 873-880.
- Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landazuri MO and Enriquez JA (2012). "NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain." *Cell Metab* 16: 378-386.
- Barrientos A (2002). "In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities." *Methods* 26: 307-316.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G and Clark JB (1995). "Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver." *Biochem Biophys Res Commun* 213: 896-900.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G and Clark JB (1996). "Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation?" *Biochem Biophys Res Commun* 218: 40-44.

Becker LB, vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ and Schumacker PT (1999). "Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion." *Am J Physiol* 277: H2240-2246.

Bell RM and Yellon DM (2003). "Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS." *J Mol Cell Cardiol* 35: 185-193.

Benhabbouche S, Crola da Silva C, Abrial M and Ferrera R (2011). "[The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection]." *Ann Fr Anesth Reanim* 30 Suppl 1: S2-16.

Benndorf R, Sun X, Gilmont RR, Biederman KJ, Molloy MP, Goodmurphy CW, Cheng H, Andrews PC and Welsh MJ (2001). "HSP22, a new member of the small heat shock protein superfamily, interacts with mimic of phosphorylated HSP27 ((3D)HSP27)." *J Biol Chem* 276: 26753-26761.

Bernardi P (2013). "The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?" *Front Physiol* 4: 95.

Bienengraeber M, Ozcan C and Terzic A (2003). "Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line." *J Mol Cell Cardiol* 35: 861-865.

Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL and Muscatello U (1997). "Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria." *Biochem Mol Biol Int* 41: 469-480.

Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G and Schulz R (2008). "The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure." *Pharmacol Ther* 120: 172-185.

Boengler K, Schulz R and Heusch G (2009). "Loss of cardioprotection with ageing." *Cardiovasc Res* 83: 247-261.

Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G and Schulz R (2010). "Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion." *Basic Res Cardiol* 105: 771-785.

Bognar Z, Kalai T, Palfi A, Hanto K, Bognar B, Mark L, Szabo Z, Tapodi A, Radnai B, Sarszegi Z, Szanto A, Gallyas F, Jr., Hideg K, Sumegi B and Varbiro G (2006). "A novel SOD-mimetic permeability transition inhibitor agent protects ischemic heart by inhibiting both apoptotic and necrotic cell death." *Free Radic Biol Med* 41: 835-848.

Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK and McCay PB (1988). "Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron." *J Clin Invest* 82: 476-485.

Bolli R (2001). "Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research." *J Mol Cell Cardiol* 33: 1897-1918.

Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM and Hafner RP (1992). "The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones." *Eur J Biochem* 206: 775-781.

Brand MD, Chien LF, Ainscow EK, Rolfe DF and Porter RK (1994). "The causes and functions of mitochondrial proton leak." *Biochim Biophys Acta* 1187: 132-139.

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL and Parker N (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." *Free Radic Biol Med* 37: 755-767.

Brand MD and Esteves TC (2005). "Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3." *Cell Metab* 2: 85-93.

Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS and Cornwall EJ (2005). "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content." *Biochem J* 392: 353-362.

Brandt U and Trumpower B (1994). "The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29: 165-197.

Bredt DS, Hwang PM and Snyder SH (1990). "Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide." *Nature* 347: 768-770.

Brown GC (1992). "Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells." *Biochem J* 284 ( Pt 1): 1-13.

Brown GC and Cooper CE (1994). "Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase." *FEBS Lett* 356: 295-298.

Brown GC and Borutaite V (2004). "Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols." *Biochim Biophys Acta* 1658: 44-49.

Bultema JB, Braun HP, Boekema EJ and Kouril R (2009). "Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato." *Biochim Biophys Acta* 1787: 60-67.

Burgering BM and Coffey PJ (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." *Nature* 376: 599-602.

Burwell LS and Brookes PS (2008). "Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury." *Antioxid Redox Signal* 10: 579-599.

Calignano A, Whittle BJ, Di Rosa M and Moncada S (1992). "Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility in vivo." *Eur J Pharmacol* 229: 273-276.

Capano M and Crompton M (2006). "Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases." *Biochem J* 395: 57-64.

Cassina A and Radi R (1996). "Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport." *Arch Biochem Biophys* 328: 309-316.

Chance B and Williams GR (1956). "The respiratory chain and oxidative phosphorylation." *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17: 65-134.

Chen L, Lizano P, Zhao X, Sui X, Dhar SK, Shen YT, Vatner DE, Vatner SF and DePre C (2011). "Preemptive conditioning of the swine heart by H11 kinase/Hsp22 provides cardiac protection through inducible nitric oxide synthase." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: H1303-1310.

Chen LM, Kuo WW, Yang JJ, Wang SG, Yeh YL, Tsai FJ, Ho YJ, Chang MH, Huang CY and Lee SD (2007). "Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats." *Exp Physiol* 92: 409-416.

Chen M, Won DJ, Krajewski S and Gottlieb RA (2002). "Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury." *J Biol Chem* 277: 29181-29186.

Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL and Lesnefsky EJ (2006). "Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion." *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1405-1412.

Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heleniak H, Colussi C, Di Meglio F, Nadal-Ginard B, Frustaci A, Leri A, Maseri A and Anversa P (2003). "Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure." *Circ Res* 93: 604-613.

Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, James AM, Cocheme HM, Reinhold J, Lilley KS, Partridge L, Fearnley IM, Robinson AJ, Hartley RC, Smith RA, Krieg T, Brookes PS and Murphy MP (2013). "Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I." *Nat Med* 19: 753-759.

Chowdary TK, Raman B, Ramakrishna T and Rao CM (2004). "Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity." *Biochem J* 381: 379-387.

Clarke SJ, McStay GP and Halestrap AP (2002). "Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A." *J Biol Chem* 277: 34793-34799.

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S and Schapira AH (1994). "Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases." *FEBS Lett* 345: 50-54.

Clementi E and Nisoli E (2005). "Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142: 102-110.

Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV and Critz SD (2005). "Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria." *Circ Res* 97: 329-336.

Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC and Garlid KD (2006a). "The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition." *J Biol Chem* 281: 20801-20808.

Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M and Garlid KD (2006b). "The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H406-415.

Coudray C, Pucheu S, Boucher F, Arnaud J, de Leiris J and Favier A (1994). "Effect of ischemia/reperfusion sequence on cytosolic iron status and its release in the coronary effluent in isolated rat hearts." *Biol Trace Elem Res* 41: 69-75.

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

Danan IJ, Rashed ER and Depre C (2007). "Therapeutic potential of H11 kinase for the ischemic heart." *Cardiovasc Drug Rev* 25: 14-29.

Das DK, George A, Liu XK and Rao PS (1989). "Detection of hydroxyl radical in the mitochondria of ischemic-reperfused myocardium by trapping with salicylate." *Biochem Biophys Res Commun* 165: 1004-1009.

Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR and Yellon DM (2006). "Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection." *Int J Biochem Cell Biol* 38: 414-419.

Degli Esposti M (1998). "Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview." *Biochim Biophys Acta* 1364: 222-235.

Depre C, Rider MH and Hue L (1998). "Mechanisms of control of heart glycolysis." *Eur J Biochem* 258: 277-290.

Depre C, Vanoverschelde JL and Taegtmeyer H (1999). "Glucose for the heart." *Circulation* 99: 578-588.

Depre C, Tomlinson JE, Kudej RK, Gaussin V, Thompson E, Kim SJ, Vatner DE, Topper JN and Vatner SF (2001). "Gene program for cardiac cell survival induced by transient ischemia in conscious pigs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9336-9341.

Depre C, Hase M, Gaussin V, Zajac A, Wang L, Hittinger L, Ghaleh B, Yu X, Kudej RK, Wagner T, Sadoshima J and Vatner SF (2002). "H11 kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo." *Circ Res* 91: 1007-1014.

Depre C, Kim SJ, John AS, Huang Y, Rimoldi OE, Pepper JR, Dreyfus GD, Gaussin V, Pennell DJ, Vatner DE, Camici PG and Vatner SF (2004). "Program of cell survival underlying human and experimental hibernating myocardium." *Circ Res* 95: 433-440.

Depre C, Wang L, Sui X, Qiu H, Hong C, Hedhli N, Ginion A, Shah A, Pelat M, Bertrand L, Wagner T, Gaussin V and Vatner SF (2006a). "H11 kinase prevents myocardial infarction by preemptive preconditioning of the heart." *Circ Res* 98: 280-288.

Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, Hong C, Hittinger L, Ghaleh B, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF and Madura K (2006b). "Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy." *Circulation* 114: 1821-1828.

Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD and Hansford RG (1995). "Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition." *J Physiol* 486 ( Pt 1): 1-13.

Di Lisa F and Bernardi P (2009). "A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition." *J Mol Cell Cardiol* 46: 775-780.

Dierick I, Irobi J, De Jonghe P and Timmerman V (2005). "Small heat shock proteins in inherited peripheral neuropathies." *Ann Med* 37: 413-422.

Dikalov S (2011). "Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases." *Free Radic Biol Med* 51: 1289-1301.

Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, Harrison DG and Dikalov SI (2010). "Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension." *Circ Res* 107: 106-116.

Djafarzadeh R, Kerscher S, Zwicker K, Radermacher M, Lindahl M, Schagger H and Brandt U (2000). "Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*." *Biochim Biophys Acta* 1459: 230-238.

Doughan AK, Harrison DG and Dikalov SI (2008). "Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction." *Circ Res* 102: 488-496.

Drazner MH (2005). "The transition from hypertrophy to failure: how certain are we?" *Circulation* 112: 936-938.

Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ and Braun HP (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3225-3229.

Efthymiou CA, Mocanu MM and Yellon DM (2005). "Atorvastatin and myocardial reperfusion injury: new pleiotropic effect implicating multiple prosurvival signaling." *J Cardiovasc Pharmacol* 45: 247-252.

Elfering SL, Sarkela TM and Giulivi C (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* 277: 38079-38086.

Elz JS and Nayler WG (1988). "Calcium gain during postischemic reperfusion. The effect of 2,4-dinitrophenol." *Am J Pathol* 131: 137-145.

Fan GC, Ren X, Qian J, Yuan Q, Nicolaou P, Wang Y, Jones WK, Chu G and Kranias EG (2005). "Novel cardioprotective role of a small heat-shock protein, Hsp20, against ischemia/reperfusion injury." *Circulation* 111: 1792-1799.

Ferrari R, di Lisa F, Raddino R and Visioli O (1982). "The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion." *J Mol Cell Cardiol* 14: 737-740.

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O and Visioli O (1993). "Myocardial damage during ischaemia and reperfusion." *Eur Heart J* 14 Suppl G: 25-30.

Folbergrova J, Ljunggren B, Norberg K and Siesjo BK (1974). "Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex." *Brain Res* 80: 265-279.

Furchgott RF and Zawadzki JV (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* 288: 373-376.

Fyhrquist F, Saijonmaa O and Strandberg T (2013). "The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease." *Nat Rev Cardiol* 10: 274-283.

Gardner PR, Costantino G, Szabo C and Salzman AL (1997). "Nitric oxide sensitivity of the aconitases." *J Biol Chem* 272: 25071-25076.

Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA and Grover GJ (1997). "Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection." *Circ Res* 81: 1072-1082.

Ghafourifar P and Richter C (1997). "Nitric oxide synthase activity in mitochondria." *FEBS Lett* 418: 291-296.

Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabo I, Lippe G and Bernardi P (2013). "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5887-5892.

Giuffre A, Sarti P, D'Itri E, Buse G, Soulimane T and Brunori M (1996). "On the mechanism of inhibition of cytochrome c oxidase by nitric oxide." *J Biol Chem* 271: 33404-33408.

Giulivi C, Poderoso JJ and Boveris A (1998). "Production of nitric oxide by mitochondria." *J Biol Chem* 273: 11038-11043.

Gober MD, Smith CC, Ueda K, Toretzky JA and Aurelian L (2003). "Forced expression of the H11 heat shock protein can be regulated by DNA methylation and trigger apoptosis in human cells." *J Biol Chem* 278: 37600-37609.

Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G and Ovize M (2007). "Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1654-1661.

Gorbunova V, Seluanov A and Pereira-Smith OM (2002). "Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis." *J Biol Chem* 277: 38540-38549.

Gorbunova V, Seluanov A and Pereira-Smith OM (2003). "Evidence that high telomerase activity may induce a senescent-like growth arrest in human fibroblasts." *J Biol Chem* 278: 7692-7698.

Griffiths EJ and Halestrap AP (1993). "Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts." *J Mol Cell Cardiol* 25: 1461-1469.

Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS, Rutter GA, Hansford RG, Stern MD and Silverman HS (1998). "Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes." *Cardiovasc Res* 39: 423-433.

Grigorieff N (1999). "Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *Curr Opin Struct Biol* 9: 476-483.



Gross ER, Hsu AK and Gross GJ (2004). "Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts." *Circ Res* 94: 960-966.

Gross ER, Hsu AK and Gross GJ (2007). "GSK3beta inhibition and K(ATP) channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion." *Basic Res Cardiol* 102: 341-349.

Gross ER, Hsu AK and Gross GJ (2008). "Delayed cardioprotection afforded by the glycogen synthase kinase 3 inhibitor SB-216763 occurs via a KATP- and MPTP-dependent mechanism at reperfusion." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1497-1500.

Gross WL, Bak MI, Ingwall JS, Arstall MA, Smith TW, Balligand JL and Kelly RA (1996). "Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5604-5609.

Groves JT and Wang CC (2000). "Nitric oxide synthase: models and mechanisms." *Curr Opin Chem Biol* 4: 687-695.

Guenebaut V, Schlitt A, Weiss H, Leonard K and Friedrich T (1998). "Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Mol Biol* 276: 105-112.

Gunter TE and Pfeiffer DR (1990). "Mechanisms by which mitochondria transport calcium." *Am J Physiol* 258: C755-786.

Hagerhall C (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." *Biochim Biophys Acta* 1320: 107-141.

Halestrap AP (2009). "What is the mitochondrial permeability transition pore?" *J Mol Cell Cardiol* 46: 821-831.

Halestrap AP and Pasdois P (2009). "The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease." *Biochim Biophys Acta* 1787: 1402-1415.

Hardie DG, Carling D and Carlson M (1998). "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?" *Annu Rev Biochem* 67: 821-855.

Hardie DG (2004). "AMP-activated protein kinase: the guardian of cardiac energy status." *J Clin Invest* 114: 465-468.

Harman D (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* 11: 298-300.

Hase M, Depre C, Vatner SF and Sadoshima J (2005). "H11 has dose-dependent and dual hypertrophic and proapoptotic functions in cardiac myocytes." *Biochem J* 388: 475-483.

Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA and Das DK (2001). "Role of STAT3 in ischemic preconditioning." *J Mol Cell Cardiol* 33: 1929-1936.

Hausenloy DJ and Yellon DM (2006). "Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning." *Cardiovasc Res* 70: 240-253.

Hausenloy DJ and Yellon DM (2007). "Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion." *Pharmacol Ther* 116: 173-191.

Hausenloy DJ, Ong SB and Yellon DM (2009). "The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning." *Basic Res Cardiol* 104: 189-202.

Hausenloy DJ and Yellon DM (2010). "The second window of preconditioning (SWOP) where are we now?" *Cardiovasc Drugs Ther* 24: 235-254.

Hederstedt L (2003). "Structural biology. Complex II is complex too." *Science* 299: 671-672.

Hedhli N, Pelat M and Depre C (2005). "Protein turnover in cardiac cell growth and survival." *Cardiovasc Res* 68: 186-196.

Hedhli N, Wang L, Wang Q, Rashed E, Tian Y, Sui X, Madura K and Depre C (2008). "Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 Kinase/Hsp22." *Cardiovasc Res* 77: 497-505.

Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, Hillmer A, Schmiedel A, Ding Z, Podewski E, Podewski E, Poli V, Schneider MD, Schulz R, Park JK, Wollert KC and Drexler H (2004). "Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury." *Circ Res* 95: 187-195.

Hoerter J, Gonzalez-Barroso MD, Couplan E, Mateo P, Gelly C, Cassard-Doulcier AM, Diolez P and Bouillaud F (2004). "Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage." *Circulation* 110: 528-533.

Hollander JM, Martin JL, Belke DD, Scott BT, Swanson E, Krishnamoorthy V and Dillmann WH (2004). "Overexpression of wild-type heat shock protein 27 and a nonphosphorylatable heat shock protein 27 mutant protects against ischemia/reperfusion injury in a transgenic mouse model." *Circulation* 110: 3544-3552.

Horwitz LD, Fennessey PV, Shikes RH and Kong Y (1994). "Marked reduction in myocardial infarct size due to prolonged infusion of an antioxidant during reperfusion." *Circulation* 89: 1792-1801.

Hoyer S and Krier C (1986). "Ischemia and aging brain. Studies on glucose and energy metabolism in rat cerebral cortex." *Neurobiol Aging* 7: 23-29.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J and Guan KL (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol* 4: 648-657.

Inoki K, Zhu T and Guan KL (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* 115: 577-590.

Jassem W and Heaton ND (2004). "The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation." *Kidney Int* 66: 514-517.

Javadov S and Karmazyn M (2007). "Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection." *Cell Physiol Biochem* 20: 1-22.

Jonassen AK, Aasum E, Riemersma RA, Mjos OD and Larsen TS (2000). "Glucose-insulin-potassium reduces infarct size when administered during reperfusion." *Cardiovasc Drugs Ther* 14: 615-623.

Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD and Yellon DM (2001). "Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling." *Circ Res* 89: 1191-1198.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN and Sollott SJ (2004). "Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore." *J Clin Invest* 113: 1535-1549.

Kadenbach B (2003). "Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1604: 77-94.

Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC and Peterson J (2001). "Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14126-14131.

Kappe G, Franck E, Verschuure P, Boelens WC, Leunissen JA and de Jong WW (2003). "The human genome encodes 10 alpha-crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10." *Cell Stress Chaperones* 8: 53-61.

Kelly KJ, Baird NR and Greene AL (2001). "Induction of stress response proteins and experimental renal ischemia/reperfusion." *Kidney Int* 59: 1798-1802.

Kim H, Xia D, Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L and Deisenhofer J (1998). "Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc1 complex from bovine heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8026-8033.

Kim HJ, Morrow G, Westwood JT, Michaud S and Tanguay RM (2010). "Gene expression profiling implicates OXPHOS complexes in lifespan extension of flies over-expressing a small mitochondrial chaperone, Hsp22." *Exp Gerontol* 45: 611-620.

Kim HS, Skurk C, Maatz H, Shiojima I, Ivashchenko Y, Yoon SW, Park YB and Walsh K (2005). "Akt/FOXO3a signaling modulates the endothelial stress response through regulation of heat shock protein 70 expression." *FASEB J* 19: 1042-1044.

Kim MV, Kasakov AS, Seit-Nebi AS, Marston SB and Gusev NB (2006). "Structure and properties of K141E mutant of small heat shock protein HSP22 (HspB8, H11) that is expressed in human neuromuscular disorders." *Arch Biochem Biophys* 454: 32-41.

Kim YC and Hummer G (2012). "Proton-pumping mechanism of cytochrome c oxidase: a kinetic master-equation approach." *Biochim Biophys Acta* 1817: 526-536.

King V and Tower J (1999). "Aging-specific expression of *Drosophila* hsp22." *Dev Biol* 207: 107-118.

Kinnally KW and Antonsson B (2007). "A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis." *Apoptosis* 12: 857-868.

Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB and Stamler JS (1995). "Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships." *Biochem Biophys Res Commun* 211: 375-381.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF and Vercesi AE (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species." *Free Radic Biol Med* 47: 333-343.

Kupriyanov VV, Yang L and Deslauriers R (1996). "Cytoplasmic phosphates in Na(+)-K+ balance in KCN-poisoned rat heart: a <sup>87</sup>Rb-, <sup>23</sup>Na-, and <sup>31</sup>P-NMR study." *Am J Physiol* 270: H1303-1311.

Kurapati R, Passananti HB, Rose MR and Tower J (2000). "Increased hsp22 RNA levels in *Drosophila* lines genetically selected for increased longevity." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55: B552-559.

Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD and Sadoshima J (2010). "NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15565-15570.

Kwong LK and Sohal RS (1998). "Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 350: 118-126.

Lambert AJ, Boysen HM, Buckingham JA, Yang T, Podlutzky A, Austad SN, Kunz TH, Buffenstein R and Brand MD (2007). "Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms." *Aging Cell* 6: 607-618.

Lancaster CR and Kroger A (2000). "Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures." *Biochim Biophys Acta* 1459: 422-431.

Laskowski A, Woodman OL, Cao AH, Drummond GR, Marshall T, Kaye DM and Ritchie RH (2006). "Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes." *Cardiovasc Res* 72: 112-123.

Laure L, Long R, Lizano P, Zini R, Berdeaux A, Depre C and Morin D (2012). "Cardiac H11 kinase/Hsp22 stimulates oxidative phosphorylation and modulates mitochondrial reactive oxygen species production: Involvement of a nitric oxide-dependent mechanism." *Free Radic Biol Med* 52: 2168-2176.

Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL, O'Connor SE and Herbert JM (2003). "Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion." *J Pharmacol Exp Ther* 306: 828-837.

Lee M, Hwang JT, Lee HJ, Jung SN, Kang I, Chi SG, Kim SS and Ha J (2003). "AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells." *J Biol Chem* 278: 39653-39661.

Leite AC, Oliveira HC, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF and Vercesi AE (2010). "Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols." *Biochim Biophys Acta* 1797: 1210-1216.

Lesnefsky EJ, Tandler B, Ye J, Slabe TJ, Turkaly J and Hoppel CL (1997). "Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria." *Am J Physiol* 273: H1544-1554.

Lesnefsky EJ, Guduz TI, Migita CT, Ikeda-Saito M, Hassan MO, Turkaly PJ and Hoppel CL (2001a). "Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III." *Arch Biochem Biophys* 385: 117-128.

Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE and Hoppel CL (2001b). "Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2770-2778.

Leung AW and Halestrap AP (2008). "Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore." *Biochim Biophys Acta* 1777: 946-952.

Li PF, Li J, Muller EC, Otto A, Dietz R and von Harsdorf R (2002). "Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC." *Mol Cell* 10: 247-258.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* 86: 147-157.

Liu Y, Fiskum G and Schubert D (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." *J Neurochem* 80: 780-787.

Lo Iacono L, Boczkowski J, Zini R, Salouage I, Berdeaux A, Motterlini R and Morin D (2011). "A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species." *Free Radic Biol Med* 50: 1556-1564.

Long R, Salouage I, Berdeaux A, Motterlini R and Morin D (2014). "CORM-3, a water soluble CO-releasing molecule, uncouples mitochondrial respiration via interaction with the phosphate carrier." *Biochim Biophys Acta* 1837: 201-209.

Loomis WF and Lipmann F (1948). "Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation." *J Biol Chem* 173: 807.

Lopez-Diazguerrero NE, Perez-Figueroa GE, Martinez-Garduno CM, Alarcon-Aguilar A, Luna-Lopez A, Gutierrez-Ruiz MC and Konigsberg M (2012). "Telomerase activity in response to mild oxidative stress." *Cell Biol Int* 36: 409-413.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193: 265-275.

MacMicking J, Xie QW and Nathan C (1997). "Nitric oxide and macrophage function." *Annu Rev Immunol* 15: 323-350.

Maeda T, Guan JZ, Koyanagi M and Makino N (2013). "Telomerase activity and telomere length distribution in vascular endothelial cells in a short-term culture under the presence of hydrogen peroxide." *Geriatr Gerontol Int* 13: 774-782.

Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G and Genova ML (2013). "MITOCHONDRIAL RESPIRATORY SUPERCOMPLEX ASSOCIATION LIMITS PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES FROM COMPLEX I." *Antioxid Redox Signal*.

Maulik SK and Kumar S (2012). "Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review." *Toxicol Mech Methods* 22: 359-366.

McCarroll SA, Murphy CT, Zou S, Pletcher SD, Chin CS, Jan YN, Kenyon C, Bargmann CI and Li H (2004). "Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging." *Nat Genet* 36: 197-204.

McDonald MC, Zacharowski K, Bowes J, Cuzzocrea S and Thiemermann C (1999). "Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion." *Free Radic Biol Med* 27: 493-503.

Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, Cung TT, Sportouch C, Angoulvant D, Finet G, Andre-Fouet X, Derumeaux G, Piot C, Vernhet H, Revel D and Ovize M (2010). "Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* 55: 1200-1205.

Misra HP and Fridovich I (1972). "The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones." *J Biol Chem* 247: 188-192.

Mitchell P (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature* 191: 144-148.

Mitchell P (1975). "Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle." *FEBS Lett* 56: 1-6.

Miwa S and Brand MD (2003). "Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling." *Biochem Soc Trans* 31: 1300-1301.

Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW and Figueredo VM (1996). "Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> overload in rat hearts." *Am J Physiol* 271: H2145-2153.

Modem S, Chinnakannu K, Bai U, Reddy GP and Reddy TR (2011). "Hsp22 (HspB8/H11) knockdown induces Sam68 expression and stimulates proliferation of glioblastoma cells." *J Cell Physiol* 226: 2747-2751.

Moncada S, Palmer RM and Higgs EA (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43: 109-142.

Morin D, Assaly R, Paradis S and Berdeaux A (2009). "Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection." *Curr Med Chem* 16: 4382-4398.

Morrow G, Inaguma Y, Kato K and Tanguay RM (2000). "The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization." *J Biol Chem* 275: 31204-31210.

Morrow G, Battistini S, Zhang P and Tanguay RM (2004a). "Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*." *J Biol Chem* 279: 43382-43385.

Morrow G, Samson M, Michaud S and Tanguay RM (2004b). "Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress." *FASEB J* 18: 598-599.

Muller FL, Liu Y, Abdul-Ghani MA, Lustgarten MS, Bhattacharya A, Jang YC and Van Remmen H (2008). "High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates." *Biochem J* 409: 491-499.

Murphy E and Steenbergen C (2008). "Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury." *Physiol Rev* 88: 581-609.

Murphy MP and Brand MD (1987). "Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain." *Nature* 329: 170-172.

Murphy MP (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* 417: 1-13.

Murry CE, Jennings RB and Reimer KA (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." *Circulation* 74: 1124-1136.

Nadtochiy SM, Tompkins AJ and Brookes PS (2006). "Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischaemia/reperfusion injury and preconditioning: implications for pathology and cardioprotection." *Biochem J* 395: 611-618.

Napiwotzki J, Shinzawa-Itou K, Yoshikawa S and Kadenbach B (1997). "ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity." *Biol Chem* 378: 1013-1021.

Narberhaus F (2002). "Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network." *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 64-93; table of contents.

Nazareth W, Yafei N and Crompton M (1991). "Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A." *J Mol Cell Cardiol* 23: 1351-1354.

Nicholls DG (1977). "The effective proton conductance of the inner membrane of mitochondria from brown adipose tissue. Dependency on proton electrochemical potential gradient." *Eur J Biochem* 77: 349-356.

Nieminen AL (2003). "Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria." *Int Rev Cytol* 224: 29-55.

Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y and Shimamoto K (2007). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection." *J Mol Cell Cardiol* 43: 564-570.

Nishino Y, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Nakamura Y, Ikeda Y, Kobayashi H and Shimamoto K (2004). "Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection." *Cardiovasc Res* 61: 610-619.

Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A and Morin D (2007). "Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization." *J Pharmacol Exp Ther* 323: 336-345.

Obame FN, Plin-Mercier C, Assaly R, Zini R, Dubois-Rande JL, Berdeaux A and Morin D (2008). "Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore." *J Pharmacol Exp Ther* 326: 252-258.

Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC and Virmani R (1987). "Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon." *Circulation* 76: 1135-1145.

Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I and Azuma J (2005). "STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart." *Cardiovasc Res* 65: 428-435.

Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A and et al. (1984). "In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury." *Circ Res* 55: 168-175.

Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP and Terzic A (2002). "Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H531-539.

Ozcan C, Palmeri M, Horvath TL, Russell KS and Russell RR, 3rd (2013). "Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H1192-1200.

Packer MA and Murphy MP (1994). "Peroxyxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A." *FEBS Lett* 345: 237-240.

Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* 327: 524-526.

Papa S, Capitanio N, Capitanio G, De Nitto E and Minuto M (1991). "The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry." *FEBS Lett* 288: 183-186.

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A and Ruggiero FM (2004). "Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin." *Circ Res* 94: 53-59.

Paradis S, Leoni V, Caccia C, Berdeaux A and Morin D (2013). "Cardioprotection by the TSPO ligand 4'-chlorodiazepam is associated with inhibition of mitochondrial accumulation of cholesterol at reperfusion." *Cardiovasc Res* 98: 420-427.

Pehowich DJ (1999). "Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak." *Biochim Biophys Acta* 1411: 192-200.

Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G and Pagliaro P (2006). "Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and protein kinase C activation." *Basic Res Cardiol* 101: 180-189.

Perreault M and Marette A (2001). "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." *Nat Med* 7: 1138-1143.

Petit PX, Susin SA, Zamzami N, Mignotte B and Kroemer G (1996). "Mitochondria and programmed cell death: back to the future." *FEBS Lett* 396: 7-13.

Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N and Paradies G (2003). "Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin." *FASEB J* 17: 714-716.

Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML and Schagger H (2003). "Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* 278: 52873-52880.

Pham FH, Sugden PH and Clerk A (2000). "Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes." *Circ Res* 86: 1252-1258.

Pietrobon D, Zoratti M and Azzone GF (1983). "Molecular slipping in redox and ATPase H<sup>+</sup> pumps." *Biochim Biophys Acta* 723: 317-321.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G and Ovize M (2008). "Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction." *N Engl J Med* 359: 473-481.

Powell SR (2006). "The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1-H19.

Qiu H, Lizano P, Laure L, Sui X, Rashed E, Park JY, Hong C, Gao S, Holle E, Morin D, Dhar SK, Wagner T, Berdeaux A, Tian B, Vatner SF and Depre C (2011). "H11 kinase/heat shock protein 22 deletion impairs both nuclear and mitochondrial functions of STAT3 and accelerates the transition into heart failure on cardiac overload." *Circulation* 124: 406-415.

Queliconi BB, Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Kowaltowski AJ and Brookes PS (2011). "Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection." *Biochim Biophys Acta* 1813: 1309-1315.

Rahman I, Kode A and Biswas SK (2006). "Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method." *Nat Protoc* 1: 3159-3165.

Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R and Maeda H (2003). "Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2171-2178.

Rhee SG (1999). "Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger." *Exp Mol Med* 31: 53-59.

Rieske JS, Zaugg WS and Hansen RE (1964). "STUDIES ON THE ELECTRON TRANSFER SYSTEM. LIX. DISTRIBUTION OF IRON AND OF THE COMPONENT GIVING AN ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE SIGNAL AT G = 1.90 IN SUBFRACTIONS OF COMPLEX 3." *J Biol Chem* 239: 3023-3030.

Ritchie RH, Quinn JM, Cao AH, Drummond GR, Kaye DM, Favalaro JM, Proietto J and Delbridge LM (2007). "The antioxidant tempol inhibits cardiac hypertrophy in the insulin-resistant GLUT4-deficient mouse in vivo." *J Mol Cell Cardiol* 42: 1119-1128.

Robin E, Guzy RD, Loor G, Iwase H, Waypa GB, Marks JD, Hoek TL and Schumacker PT (2007). "Oxidant stress during simulated ischemia primes cardiomyocytes for cell death during reperfusion." *J Biol Chem* 282: 19133-19143.

Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB and Radstake TR (2006). "Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *J Immunol* 176: 7021-7027.

Ross T, Szczepanek K, Bowler E, Hu Y, Larner A, Lesnefsky EJ and Chen Q (2013). "Reverse electron flow-mediated ROS generation in ischemia-damaged mitochondria: role of complex I inhibition vs. depolarization of inner mitochondrial membrane." *Biochim Biophys Acta* 1830: 4537-4542.

Rouslin W and Ranganathan S (1983). "Impaired function of mitochondrial electron transfer complex I in canine myocardial ischemia: loss of flavin mononucleotide." *J Mol Cell Cardiol* 15: 537-542.

Rustin P and Lance C (1991). "Succinate-driven reverse electron transport in the respiratory chain of plant mitochondria. The effects of rotenone and adenylates in relation to malate and oxaloacetate metabolism." *Biochem J* 274 ( Pt 1): 249-255.

Sarti P, Giuffre A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC and Brunori M (2000). "Nitric oxide and cytochrome c oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation." *Biochem Biophys Res Commun* 274: 183-187.



Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B and Marban E (2000). "Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide." *Circulation* 101: 439-445.

Schagger H and Pfeiffer K (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *EMBO J* 19: 1777-1783.

Schultz BE and Chan SI (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 23-65.

Semenza GL (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.

Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J and Cannon B (2006). "Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively." *Biochem J* 399: 405-414.

Shabalina IG and Nedergaard J (2011). "Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not?" *Biochem Soc Trans* 39: 1305-1309.

Sharma BK, Smith CC, Laing JM, Rucker DA, Burnett JW and Aurelian L (2006). "Aberrant DNA methylation silences the novel heat shock protein H11 in melanoma but not benign melanocytic lesions." *Dermatology* 213: 192-199.

Shen XH, Xu SJ, Jin CY, Ding F, Zhou YC and Fu GS (2013). "Interleukin-8 prevents oxidative stress-induced human endothelial cell senescence via telomerase activation." *Int Immunopharmacol* 16: 261-267.

Shimizu S, Konishi A, Kodama T and Tsujimoto Y (2000). "BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3100-3105.

Shimizu S and Tsujimoto Y (2000). "Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 577-582.

Shiraishi I, Melendez J, Ahn Y, Skavdahl M, Murphy E, Welch S, Schaefer E, Walsh K, Rosenzweig A, Torella D, Nurzynska D, Kajstura J, Leri A, Anversa P and Sussman MA (2004). "Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes." *Circ Res* 94: 884-891.

Shiva S and Gladwin MT (2009). "Nitrite mediates cytoprotection after ischemia/reperfusion by modulating mitochondrial function." *Basic Res Cardiol* 104: 113-119.

Skulachev VP (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants." *Q Rev Biophys* 29: 169-202.

Skyschally A, Schulz R and Heusch G (2010). "Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs." *Cardiovasc Drugs Ther* 24: 85-87.

Smith CC, Yu YX, Kulka M and Aurelian L (2000). "A novel human gene similar to the protein kinase (PK) coding domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) codes for a serine-threonine PK and is expressed in melanoma cells." *J Biol Chem* 275: 25690-25699.

Smith CC, Lee KS, Li B, Laing JM, Hersl J, Shvartsbeyn M and Aurelian L (2012). "Restored expression of the atypical heat shock protein H11/HspB8 inhibits the growth of genetically diverse melanoma tumors through activation of novel TAK1-dependent death pathways." *Cell Death Dis* 3: e371.

Srinivasan S and Avadhani NG (2012). "Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 53: 1252-1263.

Strauss M, Hofhaus G, Schroder RR and Kuhlbrandt W (2008). "Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane." *EMBO J* 27: 1154-1160.

Stuehr DJ (1999). "Mammalian nitric oxide synthases." *Biochim Biophys Acta* 1411: 217-230.

Sui X, Li D, Qiu H, Gaussin V and Depre C (2009). "Activation of the bone morphogenetic protein receptor by H11kinase/Hsp22 promotes cardiac cell growth and survival." *Circ Res* 104: 887-895.

Sumegi B and Srere PA (1984). "Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases." *J Biol Chem* 259: 15040-15045.

Sun X, Fontaine JM, Rest JS, Sheldon EA, Welsh MJ and Benndorf R (2004). "Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins." *J Biol Chem* 279: 2394-2402.

Szeto HH (2008). "Mitochondria-targeted cytoprotective peptides for ischemia-reperfusion injury." *Antioxid Redox Signal* 10: 601-619.

Takano H, Tang XL and Bolli R (2000). "Differential role of K(ATP) channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2350-2359.

Takeda K and Yanagida M (2005). "Regulation of nuclear proteasome by Rhp6/Ubc2 through ubiquitination and destruction of the sensor and anchor Cut8." *Cell* 122: 393-405.

Tatoyan A and Giulivi C (1998). "Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria." *J Biol Chem* 273: 11044-11048.

Terada H (1990). "Uncouplers of oxidative phosphorylation." *Environ Health Perspect* 87: 213-218.

Tichon A, Eitan E, Kurkalli BG, Braiman A, Gazit A, Slavin S, Beith-Yannai E and Priel E (2013). "Oxidative stress protection by novel telomerase activators in mesenchymal stem cells derived from healthy and diseased individuals." *Curr Mol Med* 13: 1010-1022.

Torres J, Darley-Usmar V and Wilson MT (1995). "Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration." *Biochem J* 312 ( Pt 1): 169-173.

Tsuruta F, Masuyama N and Gotoh Y (2002). "The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria." *J Biol Chem* 277: 14040-14047.

Tsutsui H, Kinugawa S and Matsushima S (2011). "Oxidative stress and heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H2181-2190.

Turrens JF (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain." *Biosci Rep* 17: 3-8.

Turrens JF (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* 552: 335-344.

Vabulas RM and Hartl FU (2005). "Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function." *Science* 310: 1960-1963.

Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Zak R, Schumacker PT and Becker LB (1996). "Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia." *Am J Physiol* 270: H1334-1341.

Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D, Pouleur H and Hue L (1992). "Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage." *Biochem J* 281 ( Pt 3): 709-715.

Vina J, Borrás C and Miquel J (2007). "Theories of ageing." *IUBMB Life* 59: 249-254.

Vinogradov AD (2001). "Respiratory complex I: structure, redox components, and possible mechanisms of energy transduction." *Biochemistry (Mosc)* 66: 1086-1097.

Vitale JM, Qiu H and Depre C (2008). "Pre-emptive conditioning of the ischemic heart." *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 6: 92-104.

Wadhwa R, Ryu J, Gao R, Choi IK, Morrow G, Kaur K, Kim I, Kaul SC, Yun CO and Tanguay RM (2010). "Proliferative functions of Drosophila small mitochondrial heat shock protein 22 in human cells." *J Biol Chem* 285: 3833-3839.

Wang H and Oster G (1998). "Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase." *Nature* 396: 279-282.

Wang L, Zajac A, Hedhli N and Depre C (2004). "Increased expression of H11 kinase stimulates glycogen synthesis in the heart." *Mol Cell Biochem* 265: 71-78.

Wardman P and Candeias LP (1996). "Fenton chemistry: an introduction." *Radiat Res* 145: 523-531.

Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnefsky EJ and Larner AC (2009). "Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration." *Science* 323: 793-797.

Weiss H and Friedrich T (1991). "Redox-linked proton translocation by NADH-ubiquinone reductase (complex I)." *J Bioenerg Biomembr* 23: 743-754.

Weiss JN, Korge P, Honda HM and Ping P (2003). "Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease." *Circ Res* 93: 292-301.

Welter R, Yu L and Yu CA (1996). "The effects of nitric oxide on electron transport complexes." *Arch Biochem Biophys* 331: 9-14.

Wikstrom M (1977). "Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria." *Nature* 266: 271-273.

Wikstrom M (2004). "Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump." *Biochim Biophys Acta* 1655: 241-247.

Wikstrom M and Hummer G (2012). "Stoichiometry of proton translocation by respiratory complex I and its mechanistic implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4431-4436.

Wilcox CS (2010). "Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress." *Pharmacol Ther* 126: 119-145.

Wittig I, Carozzo R, Santorelli FM and Schagger H (2006). "Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1757: 1066-1072.

Wong LS, van der Harst P, de Boer RA, Huzen J, van Gilst WH and van Veldhuisen DJ (2010). "Aging, telomeres and heart failure." *Heart Fail Rev* 15: 479-486.

Wu CC, Hong HJ, Chou TC, Ding YA and Yen MH (1996). "Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats." *Biochem Biophys Res Commun* 228: 459-466.

Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L and Deisenhofer J (1997). "Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria." *Science* 277: 60-66.

Xu C, Bailly-Maitre B and Reed JC (2005). "Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions." *J Clin Invest* 115: 2656-2664.

Yang Z, Lu Y, Liu J, Wang Y and Zhao X (2012). "The chaperone-like activity of rat HspB8/Hsp22 and dynamic molecular transition related to oligomeric architectures in vitro." *Protein Pept Lett* 19: 353-359.

Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G and Iwata S (2003). "Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation." *Science* 299: 700-704.

Yellon DM and Hausenloy DJ (2007). "Myocardial reperfusion injury." *N Engl J Med* 357: 1121-1135.

Yu YX, Heller A, Liehr T, Smith CC and Aurelian L (2001). "Expression analysis and chromosome location of a novel gene (H11) associated with the growth of human melanoma cells." *Int J Oncol* 18: 905-911.

Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A and Nouraei N (2006). "Morphine state-dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide." *Pharmacology* 78: 66-71.

Zelarayan L, Renger A, Noack C, Zafiriou MP, Gehrke C, van der Nagel R, Dietz R, de Windt L and Bergmann MW (2009). "NF-kappaB activation is required for adaptive cardiac hypertrophy." *Cardiovasc Res* 84: 416-424.

Zhang J, Jin B, Li L, Block ER and Patel JM (2005). "Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C840-849.

Zhang M, Mileykovskaya E and Dowhan W (2002). "Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane." *J Biol Chem* 277: 43553-43556.

Zhang X, Min X, Li C, Benjamin IJ, Qian B, Zhang X, Ding Z, Gao X, Yao Y, Ma Y, Cheng Y and Liu L (2010). "Involvement of reductive stress in the cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of heat shock protein 27." *Hypertension* 55: 1412-1417.

Zhang Z, Berry EA, Huang LS and Kim SH (2000). "Mitochondrial cytochrome bc1 complex." *Subcell Biochem* 35: 541-580.

Zhao K, Zhao GM, Wu D, Soong Y, Birk AV, Schiller PW and Szeto HH (2004). "Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury." *J Biol Chem* 279: 34682-34690.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA and Vinten-Johansen J (2003). "Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H579-588.

Zweier JL, Samouilov A and Kuppusamy P (1999). "Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems." *Biochim Biophys Acta* 1411: 250-262.

Zweier JL and Talukder MA (2006). "The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury." *Cardiovasc Res* 70: 181-190.

◆ Résumé :

Dans ce travail, nous avons montré que l'effet cardioprotecteur induit par la protéine Hsp22 était lié à une adaptation de la fonction mitochondriale *via* un mécanisme dépendant du NO. Cependant, cet effet cardioprotecteur n'est pas sans conséquence, il s'accompagne d'un stress oxydant cardiaque généralisé qui participe à l'effet hypertrophique d'Hsp22 et qui aboutit à un vieillissement prématuré du cœur et à une diminution importante de la durée de vie des animaux.

◆ Mots clés :

Hsp22, H11 kinase, mitochondrie, cardioprotection, ischémie-reperfusion myocardique, stress oxydant, NO

◆ Laboratoire de rattachement :

Institut Mondor de Recherche Biomédicale  
INSERM U 955, Equipe 03  
Faculté de Médecine de Créteil  
Université Paris-Est Créteil  
8 Rue du Général Sarrail  
94010 Créteil

◆ Pôle :

PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11  
UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »  
5, rue Jean Baptiste Clément  
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex