

UNIVERSITÉ VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2

Année 2010

Thèse N° 1711

THÈSE

pour le

Doctorat de l'Université Bordeaux 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

présentée et soutenue publiquement

le 09 Juin 2010

par

GUILLAUME CALMETTES

ANALYSE INTÉGRATIVE DE L'ADAPTATION DE L'ÉNERGÉTIQUE
CARDIAQUE À L'HYPOXIE CHRONIQUE

Travail réalisé au sein de l'UMR5536 CNRS-Université Bordeaux 2

Membres du Jury :

Mr. le Docteur	FRANCIS HARAUX	CNRS - CEA Saclay	(Président)
Mme. le Docteur	MONIQUE BERNARD	Université d'Aix-Marseille 2	(Rapporteur)
Mr. le Professeur	THIERRY BUSO	Université de Saint-Etienne	(Rapporteur)
Mr. le Professeur	GRAHAM KEMP	Université de Liverpool	(Examineur)
Mr. le Professeur	BERNARD MULLER	INSERM - Université Bordeaux 2	(Examineur)
Mr. le Professeur	JEAN-MICHEL FRANCONI	Université Bordeaux 2	(Examineur)
Mme. le Docteur	VÉRONIQUE DESCHODT-ARSAC	Université Bordeaux 2	(Examineur)
Mr. le Docteur	PHILIPPE DIOLEZ	CNRS - Université Bordeaux 2	(Directeur)

À ma famille.

REMERCIEMENTS

Une thèse est une expérience scientifique et humaine. Cette section est pour moi l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont soutenu dans mon travail.

Je voudrais remercier en premier lieu Jean-Michel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir montré son intérêt pour mon travail en mettant tout en œuvre pour que je puisse travailler dans d'excellentes conditions.

Je tiens à remercier vivement l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail :

- Le président de mon jury, Francis Haraux, dont les caricatures scientifico-politiques auront apporté beaucoup d'humour sur les murs de la cuisine du laboratoire tout au long de mes années de thèse. Merci aussi pour sa vision du Contrôle Métabolique qui aura illustré de la plus belle façon qu'il soit ma diapositive n°6.
- Mes deux rapporteurs, Monique Bernard et Thierry Busso, pour tout le temps qu'ils ont consacré à la lecture minutieuse de mon manuscrit et à la rédaction de leur rapport pertinent.
- Graham Kemp, pour n'avoir pas eu peur de traverser la manche et avoir apporté une note anglophone des plus juste lors de ma soutenance.
- Bernard Muller pour m'avoir permis d'accéder au modèle des souris hypobares qui aura rendu notre collaboration très fructueuse.

Merci aussi pour vos questions judicieuses qui auront permis d'aborder des questions scientifiques particulièrement intéressantes lors de ma soutenance orale.

Un grand merci à mes deux encadrants, Phil & Véro qui m'ont supporté sans râler (ou presque) pendant toutes ces années :

- **Phil** : En tant que directeur de thèse et **PHIL**antrope des temps modernes, tu auras sû me donner les armes nécessaires pour tirer mon épingle du jeu lors de ma quête de l'énergétique cardiaque. Tu as su m'inculquer ta **PHIL**osophie de la science. Merci à toi d'avoir su endosser la lourde responsabilité de m'encadrer avec brio, et d'être allé au delà de la seule responsabilité de "directeur" (ce n'est pas tous les jours qu'on trouve un directeur de thèse prêt à repasser la chemise de son étudiant avant une présentation orale 😊). Merci à toi d'avoir su accepter (voire comprendre) mon attirance obscure pour la programmation et l'écriture de lignes de codes. Je retiendrai aussi tous ces moments *off science* :

notre rythmique en place (enfin, on l'espère) avec laquelle nous avons tenté de (re)cadrer des sax égarés, ces repas durant laquelle la bonne humeur aura toujours régné, ou encore cette opération "*secourisme Fracture Col du Fémur*" qui nous aura appris à sauter le mur de la voisine. Merci pour tout Phil, et au plaisir de te voir en Californie !!

- **Véro** : Il paraît qu'un enregistrement prouve que je suis arrivé dans la recherche parce que je suis tombé amoureux de ma prof de bioénergétique . . . ☺ Tu dois donc être pour beaucoup dans ce que le *petit STAPSien* que j'étais est devenu. Merci pour tous ces moments scientifiques partagés à tes côtés, toutes ces discussions autour d'un coeur, d'un spectre ou d'un aimant. Merci aussi pour toutes ces sorties vélo (et tous les gâteaux qui les suivaient!!), ces visites de Palo Alto à la quête des origines de l'informatique, ou encore toutes ces discussions animées sur le fameux Claude François ("*Quoi ??? Tu as connu Claude François !!!*").

Merci à vous deux pour m'avoir donné assez de liberté pour gérer moi-même mon travail, tout en sachant m'aiguiller lorsque j'en avais besoin. Ca aura été pour moi la meilleure école qu'il soit pour découvrir, apprécier et m'exprimer dans la recherche!

Comment ne pas citer mes camarades de thèse avec lesquels nous avons rendu aux *Bisounours* leurs plus belles lettres de noblesse. Par ordre d'apparition :

- Gilles a.k.a. **Gillus** (à prononcer avec l'accent *Ricain*), un fervent défenseur des lapins, dont les histoires personnelles abracadabrantes (mais toutefois réelles) auront su rendre notre quotidien imprévisible et très pimenté. Je te souhaite la meilleure chasse au caribou qu'il soit et espère pouvoir un jour maîtriser l'art de la séduction aussi bien que toi. . .
- William a.k.a. **Will**, dont les convictions personnelles auront animé une bonne parti de nos déjeuners conviviaux. Tu resteras celui qui aura su garder la tête sur les épaules, de toutes façons, "*il ne doit en rester qu'un*".

Merci à vous les amis pour pour avoir su partager votre bonne humeur (et vos M&M's). Merci pour ces compétitions passionnées de *Chi Fou Mi* (Will, arrête de faire la pierre lol) dont les enjeux rocambolesques n'étaient au final qu'une excuse pour s'amuser (et amuser nos spectateurs). Merci aussi d'avoir feint d'ignorer mon côté "autiste" (dixit Gillus) qui vous aura des fois fait sentir bien seuls ("*Hein ? T'étais en train de me parler ?*"). La *Team Bisounours* n'a pas encore dit son dernier mot, ne vous inquiétez pas!!

Merci à la communauté Mac du labo :

- **Eric** (Mac Pro Quad Core), merci pour ta disponibilité et ta générosité scientifique. Toujours de bons conseils, tu a su, entre deux cours RMN, me faire part de ta rigueur scientifique ou encore m'ouvrir les portes du monde fascinant d'Igor. Merci aussi pour ton amitié et ton art de la côte de boeuf au barbecue (je retiendrai que rien ne vaut une bonne lampe frontale!!).

- **Sylvain** (Monsieur "1 MacBook Pro par an"), je suis arrivé au laboratoire quand tu soutenais ta thèse. Maintenant c'est à mon tour 😊 . Entre temps, nous avons affronté la pluie corse en moto, arpenté les cols du sud-est en vélo, partagé des gaufres au chocolat sur l'île d'Oléron, et j'en passe ... Tu as aussi eu la bonté de m'héberger quand je me suis retrouvé enfermé dehors lol. En tous cas, merci pour tout, pour ta bonne humeur et ton goût pour la bonne gastronomie !!
- **Zn'Elodie** (iMac 20'), tu es certainement la plus grande fan de mon crumble aux pommes (logique pour une fan d'Apple). Merci pour toutes ces discussions très philo sur la physique quantique, pour toutes ces invitations improvisées et pour tous ces récits de voyages qui donnent plus qu'envie d'aller découvrir le monde (c'est sûr, un jour j'irai moi aussi voir Angkor de mes propres yeux!!).
- **Lolo** (iMac 20' x 2), un grand ami à moi t'as surnommé *98.2 FM*, je trouve que ça résume assez bien ton personnage! Tu es l'exemple même qui montre que l'on peut parfaitement allier science et humour, ne change rien!
- **Linou** (Mac Pro Duo Core), merci pour avoir supporté ces "drôles de gars" du RMSB et avoir osé nous prêter ton humble demeure pour des soirées déjantées où les chamallows grillés (merci Alex pour ta maîtrise des braises du barbecue) et le Pepsi Max n'auront jamais manqué. Merci aussi pour ton écoute et tes conseils pertinents. Ah, une dernière chose, n'oublie pas de passer en *Shark Mode* 😊
- **Zn'Hub** (MacBook Pro 17'), merci pour m'avoir montré que la baleine pouvait aussi se faire au barbecue.
- **Fred** (PowerBook + MacBook Pro 15'), merci pour m'avoir donné une image un peu plus claire du métabolisme du trypano et de son unique mitochondrie. Ce fût un honneur et un plaisir de te cotoyer au quotidien. A moi maintenant de suivre tes traces dans le *McDonald Building*!!
- **MassoSax** (MacBook Pro 15'), merci d'avoir été un si bon président 😊 . Farceur de première, tu n'en a pas oublié ton âme d'enfant.

Merci à toutes les cuisinières du laboratoire dont les gâteaux auront su éveiller tous nos sens. Promis, un jour vous aurez le résultat du concours ...

Merci à tous ceux qui auront croisé mon chemin : les *filles du caisson* (Marie, Diana, Imane, Jennifer, Mathilde, Estelle), l'équipe cardio de l'INSERM (Pierre, Béatrice, François, Sandrine), les jeun's du labo (Charles, Émilien, Marie-Lise, Mériem, Charlène, David, Alan, Virginie, Kamel, Clément, Christophe).

Merci à celle qui aura partagé la majeure partie de ma thèse et qui aura été assez tolérante pour avoir accepté sans sourciller mes horaires de travail extensibles et toujours imprévisibles, mes conversations "boulot" ou encore les nombreux imprévus inhérents au déroulement de ma thèse. Je te remercie aussi tout simplement pour tous ces bons moments passés à tes côtés, et ton soutien sans faille. A mon tour

maintenant de te souhaiter la meilleure des réussites dans la voie qui est maintenant la tienne.

Merci à toi, illustre anonyme (qui au final ne l'est plus trop maintenant 😊), d'avoir apporté un peu de chaleur durant la toute fin de ma thèse. Les moments passés à tes côtés auront su me faire réfléchir de la meilleure façon qu'il soit . . .

Merci à toute ma super famille. Toto & Nadège, merci d'avoir accepté un pauvre doctorant sans logis en fin de thèse, et surtout d'avoir su tolérer mon mode de vie "un peu (beaucoup) décalé". J'espère pouvoir moi aussi vous rendre ce service dans un avenir très proche (non Nadège, tu ne risques rien en avion, donc traverse l'Atlantique). Jo & Dav, merci de m'avoir fait profiter de votre bonne humeur (enfin surtout Jo) mais aussi de votre mauvaise humeur (surtout Dav, lol). Enfin, Mam & Pap, comment ne pas vous remercier pour tout ce que vous avez su nous apporter. Merci de nous avoir permis et de nous avoir encouragé pour faire les études que l'on souhaitait. Merci de vous être sacrifiés par moment pour nous soutenir. Je vous en serais éternellement reconnaissant.

Enfin, un grand merci à Steve Jobs (pour son sens du show), Jonathan Ive (pour son sens du design), Bertrand Serlet (pour sa conférence de la WWDC 2006 où il aura su mêler OS de pointe et humour décapant avec brio), et à toutes leurs équipes (n'oublions pas les hommes de l'ombre!), pour m'avoir assidument accompagné durant toute ma thèse. Une pensée particulière à mon PowerBook qui aura au final vécu toute ma vie étudiante sans planter, et qui a encore un bel avenir devant lui.

"I think if you do something and it turns out pretty good, then you should go do something else wonderful, not dwell on it for too long. Just figure out what's next." - S.J. -



TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
Préface	1
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	3
0.1 ARTICLES À COMITÉ DE LECTURE	3
0.2 COMMUNICATIONS ORALES	4
0.3 POSTERS	4
0.4 PRIX ET DISTINCTIONS	5
ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
1 COEUR ET HYPOXIE CHRONIQUE	11
1.1 HYPOXIE CHRONIQUE : PHYSIOLOGIE ET PATHOPHYSIOLOGIE	13
1.1.1 L'Hypoxie Chronique d'Altitude	13
1.1.2 L'Hypoxie Chronique Pathologique	13
1.2 LE PHÉNOMÈNE D'HYPERTENSION ARTÉRIO-PULMONAIRE (HTAP)	14
1.2.1 Vasoconstriction Hypoxique	14
1.2.2 Remodelage Cardiaque	15
1.3 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE ET HYPOXIE	17
1.3.1 Le Métabolisme Énergétique Cellulaire Cardiaque	17
1.3.1.1 Production et Consommation d'Énergie	17
1.3.1.2 Couplage Excitation-Contraction	21
1.3.2 Production d'Énergie et Hypoxie	22
1.3.2.1 Effets de l'Hypoxie Aigüe	22
1.3.2.2 Effets de l'Hypoxie Chronique	23
1.3.3 Consommation d'Énergie et Hypoxie	25
1.3.3.1 Effets de l'Hypoxie Aigüe	25
1.3.3.2 Effets de l'Hypoxie Chronique	26

1.3.4	Altération de la Gestion Calcique	26
1.3.4.1	Effets de l'Hypoxie Aigüe	26
1.3.4.2	Effets de l'Hypoxie Chronique	27
1.4	CONCLUSION	27
2	ÉTUDE INTÉGRÉE DE L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE	29
2.1	VERS UNE BIOLOGIE DES SYSTÈMES	31
2.2	ANALYSE MODULAIRE DU CONTRÔLE MÉTABOLIQUE	32
2.2.1	Notion de Voie Métabolique, de Flux et de Contrôle	32
2.2.2	Décomposition d'un Système en Modules	33
2.2.3	Détermination Expérimentale des Elasticités	35
2.2.4	Calcul des Coefficients de Contrôles sur le Flux	37
2.2.5	Analyse de Régulation	38
2.3	APPLICATION À L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE	39
2.3.1	Description de l'Énergétique Cardiaque en Modules	40
2.3.2	Légitimité et Limites du Modèle	41
2.3.2.1	La phosphocréatine, intermédiaire représentatif du ΔG_p	41
2.3.2.2	L'Énergétique Cardiaque, un Système en État Station- naire Dynamique	42
	CONCLUSION	44
3	OBJECTIFS DE CETTE THÈSE	45
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
1	MODÈLE ANIMAL	49
1.1	POPULATIONS D'ÉTUDE	51
1.2	GÉNÉRATION DU MODÈLE DE SOURIS HYPOBARES	52
1.2.1	Caisson Hypobare	52
1.2.2	Diagnostic de l'Hypertrophie Ventriculaire Droite	53
2	COEUR DE SOURIS ISOLÉ-PERFUSÉ	55
2.1	CONSTRUCTION DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL	57
2.2	PERFUSION DU COEUR DE SOURIS	58
2.3	PROTOCOLES DE PERFUSION	60
2.3.1	Hypoxie Aigüe	60
2.3.2	Injection de Drogues	60
3	SUIVI DE L'ÉTAT ÉNERGÉTIQUE DES COEURS PAR RMN DU PHOSPHORE 31	63
3.1	NOTION DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)	65
3.2	ACQUISITION D'UN SPECTRE ^{31}P DE COEUR DE SOURIS	67
3.3	TRAITEMENT DES DONNÉES	68

4	MESURE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE	71
4.1	MONTAGE EXPÉRIMENTAL	73
4.2	TRAITEMENT DES DONNÉES	73
5	ANALYSE MODULAIRE DU CONTRÔLE MÉTABOLIQUE	75
5.1	DÉFINITION DU SYSTÈME MODULAIRE	77
5.2	DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES ELASTICITÉS	77
5.2.1	Élasticité du Module Producteur	78
5.2.2	Élasticité du Module Consommateur	80
5.3	CALCUL DES COEFFICIENTS DE CONTRÔLES	80
5.4	ANALYSE DE RÉGULATION	80
6	DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA CITRATE SYNTHASE	83
6.1	PRINCIPE DE LA MESURE	85
6.2	PROTOCOLE	85
6.2.1	Préparation de l'Échantillon	85
6.2.2	Mesure par Spectrophotométrie	85
6.2.3	Calcul de l'Activité de la Citrate Synthase	86
	RÉSULTATS	89
1	CARACTÉRISATION DU MODÈLE HYPOXIQUE MURIN	91
1.1	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	91
1.2	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	92
1.3	ARTICLE 1	92
2	APPLICATION DE MoCA SUR LES COEURS HYPOXIQUES	101
2.1	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	101
2.2	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	101
2.3	ARTICLE 2	102
3	INSENSIBILITÉ DES COEURS HYPOXIQUES À LA BAISSÉ D'OXYGÈNE	111
3.1	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	111
3.2	RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	112
3.3	ARTICLE 3	113
	DISCUSSION - PERSPECTIVES	123
1	DISCUSSION	125
1.1	PARTICULARITÉS DE L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE DE LA SOURIS	125
1.2	COEUR DE SOURIS EN SITUATION D'HYPOXIE CHRONIQUE	127
1.3	ANALYSE MoCA DES COEURS EN CONDITION D'HYPOXIE AIGÛE	131

2 PERSPECTIVES	133
2.1 POURSUITES DIRECTES DE CE TRAVAIL DE THÈSE	133
2.2 PERSPECTIVES GÉNÉRALES	134
 BIBLIOGRAPHIE	 135
 BIBLIOGRAPHIE	 137

LISTE DES FIGURES

1	Pression partielle d'oxygène et altitude	14
2	Remodelage Artériolaire Pulmonaire Hypoxique	15
3	Modifications anatomiques cardiaques induites par l'HTAP	16
4	Métabolisme Énergétique Cellulaire Cardiaque	17
5	Chaîne respiratoire mitochondriale	19
6	La PCr métabolite central de l'énergétique musculaire	20
7	Couplage excitation-contraction	21
8	Étude du contrôle d'une voie métabolique par détermination de l'étape limitante	33
9	Maintien de l'état stationnaire par les cinétiques des modules	35
10	Détermination des coefficients d'élasticités	36
11	Définition de l'Énergétique Cardiaque en Différents Modules	40
12	Relation linéaire entre consommation d'oxygène et activité contractile dans le coeur	41
13	Oscillations des métabolites phosphorylés pendant le cycle cardiaque	43
14	Courbe de poids des souris SWISS	51
15	Caisson Hypobare	52
16	Mesure des modifications anatomiques cardiaques	54
17	Schéma du montage expérimental	57
18	Montage de perfusion de coeur de souris	58
19	Tracé expérimental typique de la pression ventriculaire gauche	59
20	Phénomène de RMN	65
21	Relaxation RMN	66
22	Spectre RMN ³¹ P typique	67
23	Développement d'un système dédié à l'acquisition ³¹ P sur coeur isolé perfusé de souris	68
24	Traitement numérique des spectres RMN	69
25	Dispositif Expérimental de Mesure de Consommation d'Oxygène	73
26	Traces expérimentales typiques de la mesure de consommation d'oxygène des coeurs perfusés	74

27	Description de l'Énergétique Cardiaque en Différents Modules	77
28	Détermination Expérimentale des Elasticités	78
29	Application expérimentale de l'Analyse du Contrôle sur coeur isolé perfusé de souris	79
30	Mesure par spectrophotométrie de l'activité de la citrate synthase	87

LISTE DES TABLEAUX

1	Drogues utilisées pour moduler l'énergétique des coeurs	61
2	Paramètres d'acquisition des spectres ^{31}P de coeurs isolés perfusés sur aimant DPX500	69
3	Réactifs utilisés pour le dosage de la Citrate Synthase	86

PRÉFACE

LE fonctionnement de l'organisme entier dépend en permanence de l'activité contractile du muscle cardiaque. Le coeur humain se contracte en moyenne 100000 fois par jour et pompe dans le même temps environ 10000 litres de sang (Reimer and Jennings 1986). Pour réaliser cette performance, les cellules cardiaques ont un besoin constant d'énergie. La phosphorylation oxydative, strictement dépendante de la présence d'oxygène, assure la majorité de la production d'ATP.

L'hypoxie se définit comme un apport en oxygène insuffisant pour satisfaire les besoins tissulaires (Reimer and Jennings 1986). Dans une telle situation, un déficit énergétique se crée, l'énergie générée au cours de la phosphorylation oxydative n'étant pas suffisante pour maintenir l'équilibre entre production et utilisation d'énergie.

Si beaucoup de travaux ont été consacrés au problème de l'ischémie, en revanche, moins d'études ont été réalisées sur l'hypoxie. Cependant, la compréhension des relations entre la fonction contractile cardiaque et les processus d'apport d'énergie en hypoxie est indispensable, car l'hypoxie est avant tout une **réalité clinique**. Elle est une composante importante de l'ischémie myocardique, situation dans laquelle aux effets de la diminution de l'apport en oxygène s'ajoutent ceux de la diminution du débit coronaire. L'hypoxie se retrouve aussi dans toutes les pathologies liées à l'insuffisance respiratoire. L'altitude est également à l'origine d'une hypoxie, la diminution de la pression barométrique impliquant une baisse de la pression partielle d'oxygène dans le sang conduisant à une hypoxie.

Ainsi, l'hypoxie est un problème qui se retrouve à la fois dans des situations pathologiques ou physiologiques.

L'objectif de cette thèse a été d'utiliser l'approche intégrative développée par notre équipe, l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA), pour étudier les modifications induites par l'hypoxie au niveau de l'énergétique cardiaque. Dans ce but, l'approche MoCA, a été appliquée sur des coeurs isolés perfusés de souris contrôles et hypobares (souris soumises 21 jours à une hypoxie hypobarique). En effet, la compréhension des phénomènes biologiques nécessite la considération des mécanismes à un haut niveau d'intégration. MoCA est aujourd'hui la seule approche permettant la description fine des régulations internes du fonctionnement du système énergétique cardiaque, et son application sur le modèle du coeur hypoxique devrait permettre une meilleure compréhension des adaptations cardiaques développées pendant l'hypoxie chronique. Cette thèse est organisée, à la manière d'un article scientifique, en 4 grandes parties.

- Une *introduction* expose les grandes problématiques de la thèse, avec une revue de la littérature sur les modifications cardiaques à l'hypoxie chronique. Les concepts de l'Analyse Modulaire du Contrôle ainsi que son application pour l'étude de l'énergétique cardiaque sont également développés dans cette partie.
- L'ensemble des techniques utilisées qui ont été mises au point et utilisées durant cette thèse sont ensuite détaillées dans une partie *Matériels et Méthodes*.
- Les principaux *Résultats* issus de cette thèse sont ensuite présentés. L'ensemble des travaux faisant l'objet de cette thèse ont été publiés sous formes d'articles dans des revue à comité de lecture.
- Enfin, ces résultats et les perspectives qui en découlent seront discutés en *Discussion*.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

0.1 ARTICLES À COMITÉ DE LECTURE

Articles présentés dans ce document de thèse :

Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Thiaudiere E, Muller B, and Diolez P. *Modular Control Analysis of Effects of Chronic Hypoxia on Mouse Heart*, Am J Physiol Regul Integr Comp, **2008** Dec ;295(6) :R1891-7

Miroux S, **Calmettes G**, Massot P, Lefrançois W, Parzy E, Muller B, Arsac LM, Deschodt-Arsac V, Franconi JM, Diolez P, and Thiaudiere E. *4D Retrospective Black Blood TrueFISP Imaging of Mouse Heart*, Magn Res in Med, **2009** Nov ;62(5) :1099-105

Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Gouspillou G, Miroux S, Muller B, Franconi JM, Thiaudiere E, and Diolez P. *Improved Energy Supply Regulation in Chronic Hypoxic Mouse Counteracts Hypoxia-Induced Altered Cardiac Energetics*, PLOS One, **2010** Feb ;5(2) :e9306

Autres Articles :

Korzeniewski B, Deschodt-Arsac V, **Calmettes G**, Franconi JM, and Diolez P. *Physiological Heart Activation by Adrenaline Involves Parallel Activation of ATP Usage and Supply*, Biochem J, **2008** Jul 15 ;413(2) :343-7

Korzeniewski B, Deschodt-Arsac V, **Calmettes G**, Gouspillou G, Franconi JM, and Diolez P. *Effect of Pyruvate, Lactate and Insulin on ATP Supply and Demand in Unpaced Perfused Rat Heart*, Biochem J, **2009** Oct 12 ;423(3) :421-8

Gouspillou G, Bourdel-Marchasson I, Rouland R, **Calmettes G**, Franconi JM, Deschodt-Arsac V, and Diolez P. *Alteration of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Aged Skeletal Muscle Involves Modification of Adenine Nucleotide Translocator*, BBA Bioenergetics, **2010** Feb ;1797(2) :143-151

Cochet H, Montaudon M, Laurent F, **Calmettes G**, Franconi JM, Miroux S, Thiaudiere E, and Parzy E. *In Vivo MR Angiography and Velocity Measurement in Mice Coronary Arteries at 9.4 Tella : A Tool for Coronary Flow Velocity Reserve Assessment*, Radiology, **2010** Feb ;254(2) :441-8

0.2 COMMUNICATIONS ORALES

Communications Internationales :

Increased Elasticity Detected in Chronic Hypoxic Mouse Heart by Modular Control Analysis
13th Workshop of the International Study Group for Systems Biology, 17-20 Août
2008, Elsinore (Danemark)

Communications Nationales :

Adaptation de l'Énergétique Cardiaque à l'Hypoxie Chronique : Étude par Analyse Modulaire du Contrôle
Congrès Annuel du Groupe Français de Bioénergétique, 21-24 Juin 2007, Île d'Oléron (France)

³¹P NMR Spectroscopy and Systems Biology : Integrative Tool for Investigating in situ Cardiac Energetics
Journée Jeunes Chercheurs, 22 Mai 2008, Bordeaux (France)

Adaptation de l'Énergétique Cardiaque à l'Hypoxie Chronique
26^e Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire,
2-3 Avril 2009, Nancy (France)

Modifications Induites par l'Hypoxie Chronique et l'Ischémie sur l'Énergétique Cardiaque chez la Souris
Journée Scientifique Annuelle de l'Institut Fédératif de Recherche 4, 19 Mai
2009, Bordeaux (France)

0.3 POSTERS

Présentations Internationales :

Modular Control Analysis of Mouse Heart Energetics
10th International Conference on Systems Biology, 30 Août - 4 Septembre 2009,
Stanford (USA)

Présentations Nationales :

Adaptation de l'Énergétique Cardiaque à l'Hypoxie Chronique
26^e Congrès Annuel du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire,
2-3 Avril 2009, Nancy (France)

o.4 PRIX ET DISTINCTIONS

Prix de la Meilleure Communication Orale

Journée Jeunes Chercheurs, 22 Mai 2008, Bordeaux (France)

Sélection au Programme Scientifique Européen du British Council

Sélectionné et financé pour participer au programme européen "Building a Successful International Scientific Career", 9-11 Septembre 2009, Bonn (Germany)

ABRÉVIATIONS

α KG	α -cétooglutarate
ANT	Translocateur ADP/ATP
ATP	Adenosine Trisphosphate
CoA	Coenzyme A
CPT ₁	Carnitine palmitoyltransferase 1
CPT ₂	Carnitine palmitoyltransferase 2
DPVG	Différence de pression développée par le ventricule gauche
Δ Gp	Energie libre d'hydrolyse de l'ATP
EPO	Erythropoïétine
FADH ₂	Flavine Adénine Dinucléotide réduit
FC	Fréquence cardiaque
FID	Free Induction Decay
GLUT	Transporteurs facilitatifs du glucose
HAD	Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
HK	Hexokinase
HTAP	Hypertension Artério-Pulmonaire
IAA	Iodoacétate (acide iodoacétique)
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LDH	Lactate déshydrogénase
MCU	Uniport calcique mitochondrial
miCK	Créatine Kinase mitochondriale
mbCK	Créatine Kinase cytosolique cardiaque
MVO ₂	Consommation myocardique d'oxygène
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NCX	Échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺ du sarcolème
NHX	Échangeur Na ⁺ /H ⁺ du sarcolème
O ₂	Dioxygène
P _{O₂}	Pression partielle en oxygène
PA _{O₂}	Pression partielle alvéolaire en oxygène
Pa _{O₂}	Pression partielle artérielle en oxygène

PCr	Phosphocréatine
³¹ P	Phosphore 31
P _i	Phosphate Inorganique
PHD	Prolyl-hydroxylases
PPF	Produit Pression Fréquence ($DPVG \times FC$)
PTP	Pore de transition mitochondrial
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces oxygénées réactives (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RS	Réticulum sarcoplasmique
RyR	Récepteur à la Ryanodyne
SERCA	Sarco(end)plasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SGLT ₁	Cotransporteurs glucose-sodium
UCP	Protéines découplante de la membrane interne mitochondriale
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Première partie

INTRODUCTION

COEUR ET HYPOXIE CHRONIQUE

1

SOMMAIRE

1.1	HYPOXIE CHRONIQUE : PHYSIOLOGIE ET PATHOPHYSIOLOGIE	13
1.1.1	L'Hypoxie Chronique d'Altitude	13
1.1.2	L'Hypoxie Chronique Pathologique	13
1.2	LE PHÉNOMÈNE D'HYPERTENSION ARTÉRIO-PULMONAIRE (HTAP)	14
1.2.1	Vasoconstriction Hypoxique	14
1.2.2	Remodelage Cardiaque	15
1.3	MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE ET HYPOXIE	17
1.3.1	Le Métabolisme Énergétique Cellulaire Cardiaque	17
1.3.2	Production d'Énergie et Hypoxie	22
1.3.3	Consommation d'Énergie et Hypoxie	25
1.3.4	Altération de la Gestion Calcique	26
1.4	CONCLUSION	27

L'HYPOXIE se définit comme la diminution de l'apport d'oxygène aux tissus. Elle est le plus souvent la conséquence d'une hypoxémie (diminution de la quantité d'oxygène contenue dans le sang) ou de la diminution de l'apport du volume sanguin.

Dans un premier temps subie de manière aiguë, cette situation peut devenir chronique pour l'homme lors de séjours prolongés en altitude, mais également lors du développement de certaines pathologies, en particulier les atteintes pulmonaires et les insuffisances respiratoires.

Quelle qu'en soit l'origine, l'hypoxie a un très fort retentissement sur le système cardiovasculaire, et en particulier sur l'ensemble de l'énergétique cardiaque très dépendante de l'oxygène.

1.1 HYPOXIE CHRONIQUE : PHYSIOLOGIE ET PATHOPHYSIOLOGIE

1.1.1 L'Hypoxie Chronique d'Altitude

Sous l'influence d'un courant de pensée mené par le suédois Carl Wilhelm Scheele (1742-1786), l'anglais Joseph Priestley (1733-1804) ou encore le français Antoine Lavoisier (1743-1794), qui laisseront ainsi leur nom à l'histoire, le 18^e siècle fut marqué par la découverte de l'oxygène (1774) et son rôle dans les oxydations phosphorylantes. Au début du mois d'août 1787, Horace-Bénédict de Saussure gravit le Mont-Blanc, ressentit d'intenses troubles physiopathologiques et les mit sur le compte du déficit en oxygène. Était donc acquise la notion de pression partielle d'oxygène (P_{O_2}) comme condition de la vie, même si elle ne sera exprimée avec ces mots qu'avec les travaux de Bert (1878).

En altitude, la diminution de pression de l'air atmosphérique implique la diminution de la pression partielle de chacun des gaz qui le composent, dont celle du dioxygène (O_2). Ainsi, lors d'une inspiration, cette diminution de P_{O_2} conduit à une diminution de la pression partielle alvéolaire pulmonaire en O_2 (PA_{O_2}), ce qui limite sa diffusion dans le sang (diminution de la pression partielle d' O_2 artérielle, Pa_{O_2}) et peut limiter son apport aux cellules en fonction de la saturation en O_2 de l'hémoglobine (figure 1). Cette situation est particulièrement préjudiciable pour les organes majoritairement oxydatifs, comme le coeur, puisque la diminution d'oxygène se répercute directement au niveau de la tension d' O_2 dans les mitochondries (Gnaiger et al. 1995, Mik et al. 2009) (figure 1), compromettant alors l'ensemble du métabolisme énergétique de l'organe (Gnaiger et al. 1995, Gnaiger 2001).

L'hypoxie d'altitude est subie de manière chronique par les populations natives des hauts plateaux (Cordillère des Andes, Chaîne Hymalienne, ...) ou lors de séjours occasionnels en altitude (*ex* : stage d'entraînement en altitude pour les sportifs).

1.1.2 L'Hypoxie Chronique Pathologique

Dans le domaine médical, l'hypoxie est une conséquence préoccupante de nombreuses pathologies. La diminution d' O_2 est par exemple un paramètre important de l'ischémie myocardique, situation dans laquelle les effets de la diminution de l'apport d'oxygène s'ajoutent aux effets de la diminution du débit coronaire. L'hypoxie se rencontre aussi dans toutes les pathologies liées à l'insuffisance respiratoire ; cette dernière peut être d'origine restrictive (maladies de la cage thoracique ou maladies neuromusculaires) ou avoir pour cause des troubles de la diffusion (lésions inflammatoires qui entraînent un épaississement des parois alvéolo-capillaires) ou une atteinte vasculaire (coeur pulmonaire chronique post-embolique ou thrombose chronique des artères pulmonaires). L'insuffisance respiratoire peut également être chronique d'origine obstructive (modification de la résistivité du poumon ou anomalie du rapport ventilation-perfusion). L'hypoxie est également présente dans les cas d'anémie sévère, dans les anomalies de la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine (hypoxie hy-

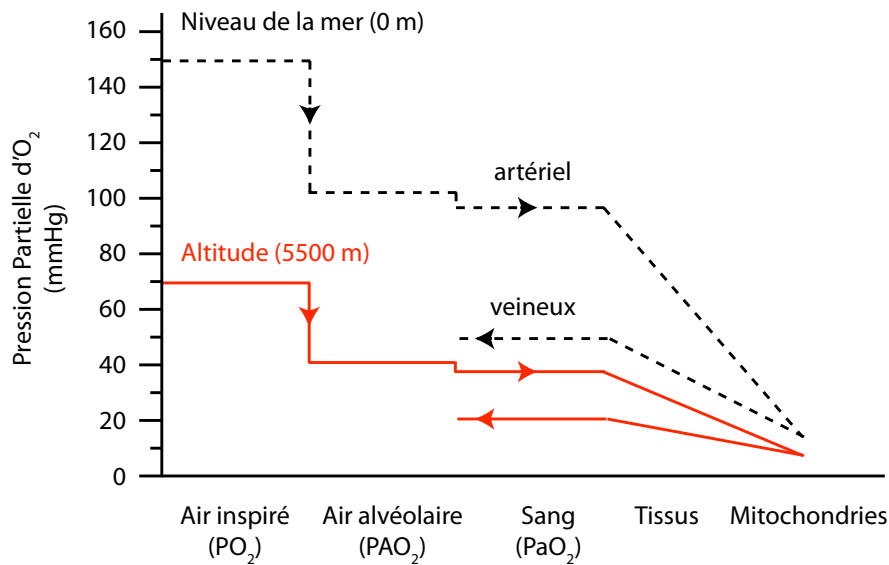


FIG. 1 – *Pression partielle d'oxygène et altitude.* L'oxygénation des tissus dépend des gradients de pression partielle en oxygène, selon la loi de Fick. En altitude, les gradients de pression sont diminués à chaque étape, ce qui entraîne la diminution de l'apport d'oxygène aux mitochondries.

poxémique) ou de la libération de l'oxygène de la molécule d'hémoglobine (hypoxie normoxique).

1.2 LE PHÉNOMÈNE D'HYPERTENSION ARTÉRIO-PULMONAIRE (HTAP)

1.2.1 Vasoconstriction Hypoxique

Depuis les travaux de [Von Euler and Liljestrand \(1946\)](#), il est établi que l'hypoxie alvéolaire aiguë entraîne chez l'homme, mais également chez la plupart des mammifères, une vasoconstriction pulmonaire à l'origine d'une élévation des résistances vasculaires périphériques et de la pression artérielle pulmonaire.

La circulation pulmonaire est la seule circulation d'organe capable de réagir à une hypoxie par une vasoconstriction. Il est actuellement établi que c'est le muscle lisse des petites artères pulmonaires (de calibre inférieur à $300 \mu m$) qui se contracte en situation d'hypoxie. Ces artérioles se trouvent au niveau des bronchioles terminales du poumon. Le stimulus essentiel est la baisse de PaO_2 en dessous d'un seuil se situant autour de 60 mmHg chez l'homme ([Guenard 2001](#)). Cette vasoconstriction hypoxique apparaît comme un mécanisme induisant, dans un territoire donné, l'ajustement de la perfusion capillaire pulmonaire à la ventilation alvéolaire, permettant ainsi une amélioration de l'oxygénation artérielle en maintenant un rapport ventilation/perfusion au plus proche de la valeur optimale ([Brimioulle et al. 1996](#)). La vasoconstriction hypoxique résulte essentiellement d'une inhibition de canaux potassium

voltage-dépendants des cellules musculaires lisses avec une modulation endothéliale (Weir and Archer 1995).

Cette vasoconstriction hypoxique initiale est rapidement suivie par un remodelage artériolaire, principalement dû à la mise en place de processus inflammatoires intenses dans les 8 premières heures. Cependant, après plusieurs jours d'exposition, l'infiltration des cellules inflammatoires diminue fortement et ce remodelage se limite principalement à une hypertrophie médiale des artérioles pulmonaires avec quelques proliférations adventitielles, mais peu ou pas d'épaississement intimal (figure 2) (Chen et al. 1995).

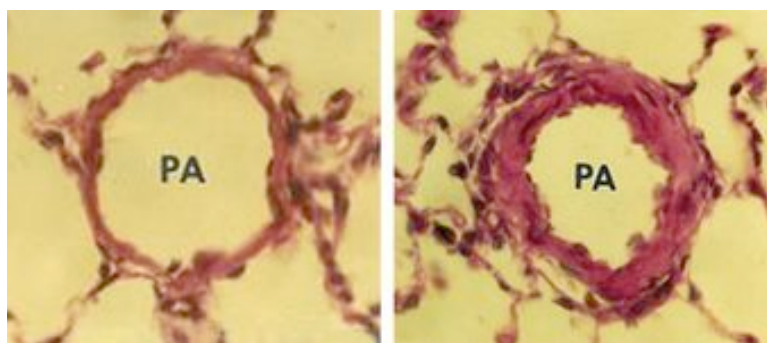


FIG. 2 – *Remodelage Artériolaire Pulmonaire Hypoxique*. Coupes transversales d'artérioles pulmonaires (PA) de rat contrôle (à gauche) et de rat soumis à deux semaines d'hypoxie (à droite). L'hypoxie a provoqué une hypertrophie médiale, sans modifications intimales ou adventitielles. (Figure issue de Chen et al. (1995))

1.2.2 Remodelage Cardiaque

La diminution de la vasomotricité pulmonaire et l'installation d'un remodelage artériolaire dans le phénomène d'HTAP sont responsables de l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires à l'écoulement sanguin. Cette résistance vasculaire plus importante s'installe en effet sans variation du débit sanguin pulmonaire, qui est imposé par le débit sanguin systémique (la totalité du sang passe dans le poumon, quelle que soit la pression artérielle pulmonaire), d'où une augmentation des pressions capillaires.

Le coeur est particulièrement sensible à cette modification de la pression sanguine, et l'accroissement des résistances vasculaires à l'origine de l'HTAP se traduit, sur le plan hémodynamique, par une augmentation de la post-charge du ventricule droit. Cette sollicitation chronique provoque un remodelage de ce ventricule, qui est une structure très COMPLIANTE, et a notamment pour conséquence une dilatation et une hypertrophie du myocarde droit (figure 3) menant à l'insuffisance cardiaque droite. En effet, contrairement à la perfusion coronaire gauche qui se fait principalement durant la diastole, la perfusion coronaire droite d'un coeur sain a lieu à la fois en systole et en diastole. En cas d'hypertension artérielle pulmonaire, la perfusion coronaire

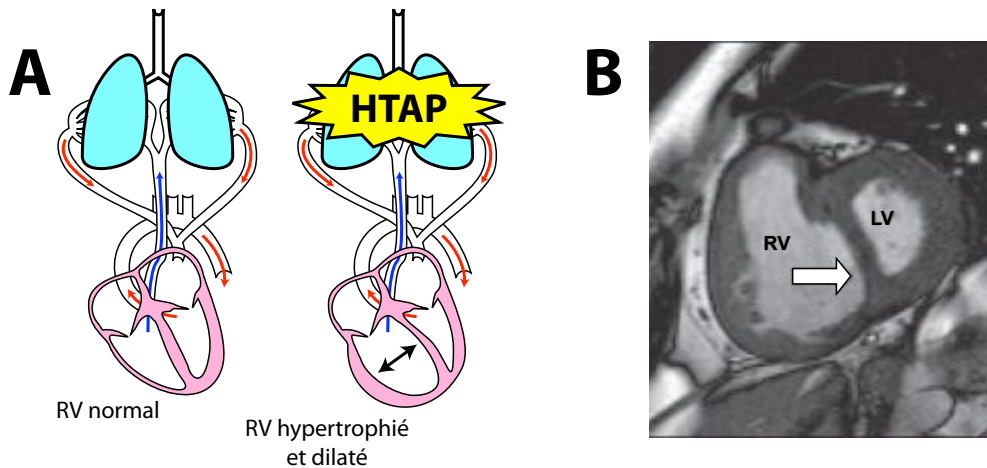


FIG. 3 – *Modifications anatomiques cardiaques induites par l'HTAP. A) L'augmentation de la post-charge du ventricule droit induite par l'HTAP entraîne une sollicitation excessive de ce ventricule, menant à une hypertrophie et dilatation sévère. Cette modification anatomique est à l'origine de la diminution de la cavité ventriculaire gauche du fait du déplacement du septum interventriculaire vers l'intérieur de cette cavité. B) Image par Résonance Magnétique du coeur d'un patient atteint d'une hypertension pulmonaire (vue en petit axe, phase de début de diastole) (image issue de [Blyth and Peacock \(2009\)](#)). Le ventricule droit est dilaté et hypertrophié, et le septum interventriculaire (flèche blanche) est déplacé vers le ventricule gauche. RV : Ventricule Droit. LV : Ventricule Gauche.*

droite n'est plus assurée qu'en diastole (pressions trop importantes lors de la systole), diminuant ainsi l'apport en oxygène alors que les besoins du coeur augmentent.

De plus, le péricarde entourant le coeur étant inextensible, il existe un haut degré d'interdépendance entre les deux ventricules, médié par les mouvements du septum ([Clyne et al. 1989](#), [Jardin 2003](#)). Ainsi, la modification de la géométrie du ventricule droit consécutive à l'HTAP, et plus particulièrement sa dilatation, entraîne le déplacement du septum interventriculaire vers la cavité du ventricule gauche (figure 3). Ce décalage altère la fonction ventriculaire gauche par réduction de volume de ce ventricule, diminuant à la fois sont remplissage et sa compliance ([Louie et al. 1986](#), [Marcus et al. 2001](#)).

Le développement d'une HTAP hypoxique chronique secondaire à l'hypoxie a donc un retentissement global sur la fonction cardiaque, et entraîne une insuffisance des deux ventricules.

1.3 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE ET HYPOXIE

1.3.1 Le Métabolisme Énergétique Cellulaire Cardiaque

1.3.1.1 Production et Consommation d'Énergie

Toute cellule requiert un apport d'énergie constant pour assurer son fonctionnement. Dans les cellules cardiaques, les réactions consommant majoritairement l'énergie sont liées à la contraction, avec les ATPases myofibrillaires, les pompes Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et les pompes Na^+/K^+ -ATPases du sarcolème (Rolfe and Brown 1997, Ingwall and Weiss 2004) (figure 4). La synthèse et la dégradation des (macro)molécules consomment également de l'énergie, mais dans une plus faible mesure (figure 4).

Cette énergie provient essentiellement des réactions du catabolisme, à l'origine de la génération d'énergie sous forme d'ATP et de cofacteurs réduits, Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) et Flavine Adénine Dinucléotide (FADH_2) (figure 4). Les cellules cardiaques peuvent ainsi oxyder différents substrats, comme le glucose, les acides gras, le lactate, le pyruvate, et même les acides aminés et les corps cétoniques (Bing and Fenton 1965).

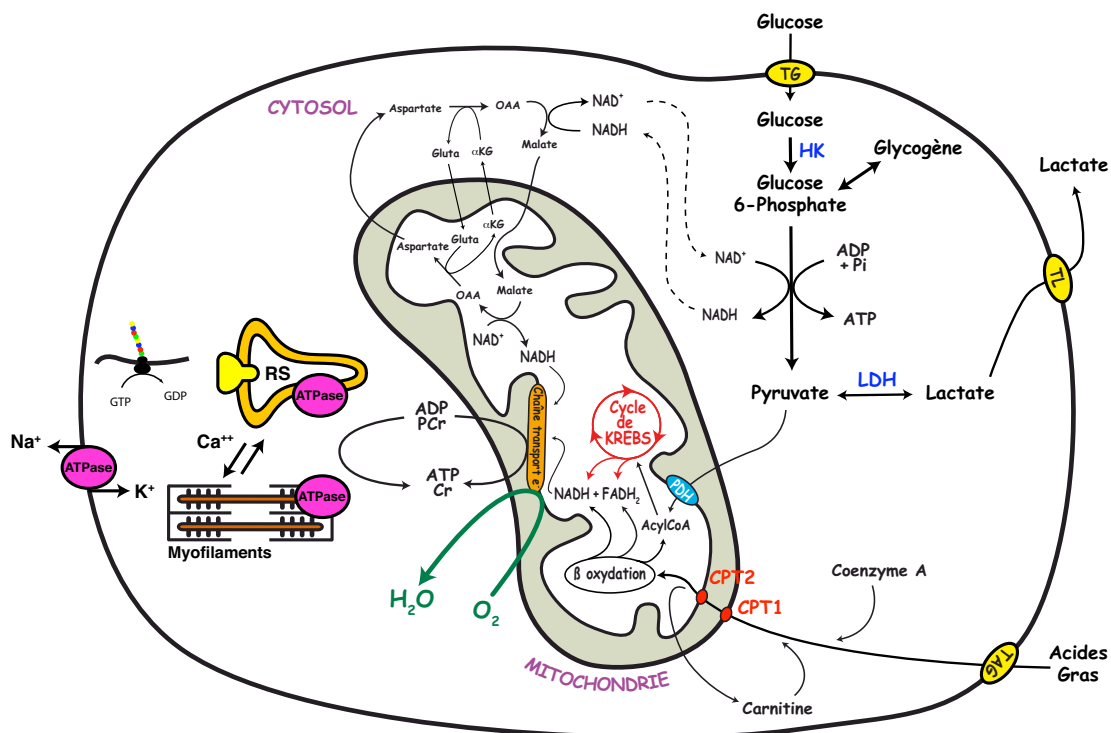


FIG. 4 – Métabolisme Énergétique Cellulaire. TG, transporteurs de glucose. TL, transporteurs de lactate. TAG, transporteurs des acides gras. HK, hexokinase. LDH, lactate déshydrogénase. CPT₁ et CPT₂, carnitine palmitoyl transferase 1 et 2. Gluta, glutamate. OAA, oxaloacétate. αKG, α-cétoglutarate. RS, réticulum sarcoplasmique. GTP, guanine triphosphate. GDP, guanine diphosphate.

La membrane cellulaire est imperméable au glucose. Celui-ci doit donc, pour entrer ou sortir de la cellule, transiter par des transporteurs spécifiques (TG, figure 4) qui sont des protéines transmembranaires. Dans les cardiomyocytes, il s'agit majoritairement des transporteurs facilitatifs de glucose, (GLUT, (Pessin and Bell 1992, Joost and Thorens 2001)), essentiellement les isoformes GLUT-1 et GLUT-4. Après son entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate, réaction catalysée par l'hexokinase (HK), avant d'être dégradé dans la glycolyse (figure 4). Au cours de cette dernière, en plus de la phosphorylation directe d'ADP en ATP de manière anaérobie, des équivalents réducteurs (essentiellement sous forme de NADH) sont générés, et transfèrent leurs électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale. D'autres équivalents réducteurs (NADH et FADH₂) sont issus de la dégradation du pyruvate par le cycle de Krebs et participent également à l'alimentation de la chaîne respiratoire en électrons (figure 4). Le NADH ne peut passer directement la membrane interne mitochondriale. Les cofacteurs réduits issus de la voie glycolytique sont en fait transportés dans la mitochondrie par un système de navette. La navette la plus importante pour l'oxydation du NADH cytosolique est la navette malate/aspartate, où l'oxaloacétate est réduit en malate dans le compartiment cytoplasmique, la réaction inverse ayant lieu dans la mitochondrie (figure 4).

Après l'activation, dans le cytoplasme, des acides gras à longue chaîne (12 à 20 carbones) en acyl-CoA, réaction catalysée par l'acyl-CoA synthase, leur entrée dans la mitochondrie met également en jeu un système de transport impliquant l'action concertée de la carnitine, de la carnitine-palmitoyl transférase 1 (CPT₁), de l'acyl-carnitine translocase, et de la carnitine-palmitoyl transférase 2 (CPT₂) (McGarry and Brown 1997) (figure 4). En revanche, les acides gras à chaîne moyenne (6 à 10 carbones) et courte (2 à 4 carbones) pénètrent dans la mitochondrie par simple diffusion à travers la membrane interne. Les acides gras sont ensuite dégradés par la β -oxydation, permettant la génération d'acyl-CoA et de NADH-FADH₂ qui seront pris en charge respectivement par le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire (figure 4).

La libération des équivalents réducteurs au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale implique des mécanismes de transfert d'électrons entre les différents complexes enzymatiques, couplant l'oxydation du NADH et du FADH₂ à l'extrusion de protons (H⁺) de la matrice mitochondriale dans l'espace intermembranaire (figure 5). De par sa fonction d'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale, l'oxygène joue donc un rôle essentiel dans l'ensemble de ce processus (figure 5).

Cette distribution des charges électriques de part et d'autre de la membrane interne est responsable de l'établissement d'un potentiel électrochimique ($\Delta\mu_{H^+}$) ou force protonmotrice, qui est converti en potentiel de phosphorylation ($\Delta G_{p_{mito}}$) par l'ATP synthase en couplant la phosphorylation d'ADP au retour des protons dans la matrice (Mitchell 1961) (figure 5). Cependant le rendement de ce système dépend de l'importance des fuites de protons, qu'elles soient dues à la perméabilité naturelle de la membrane interne ou aux protéines découplantes (UCP, pour *Uncoupling Protein*)

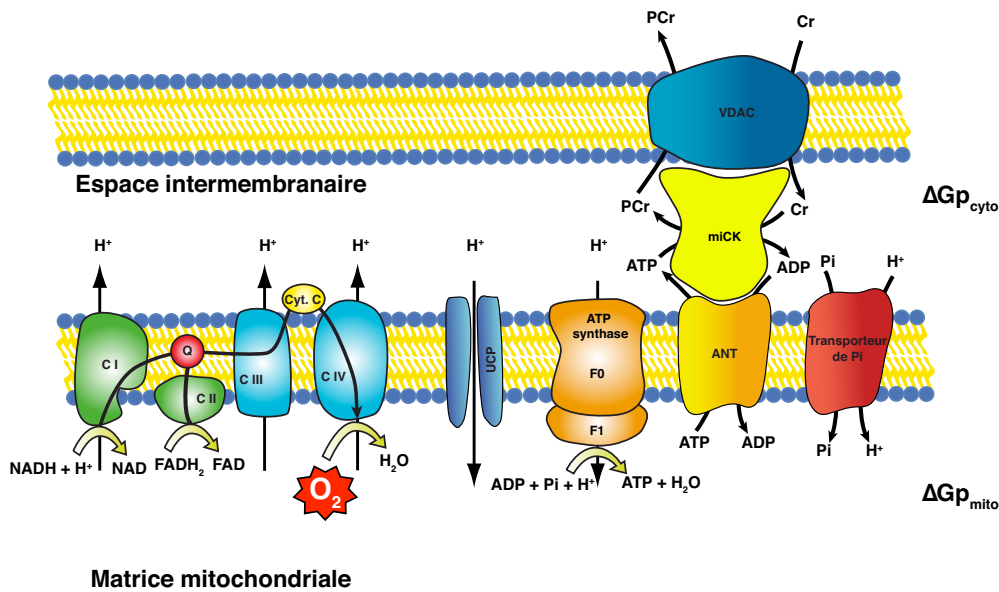


FIG. 5 – Chaîne respiratoire mitochondriale.

présentes dans cette membrane (figure 5). Il a été montré que ces fuites sont uniquement dépendantes du potentiel de membrane (Brand et al. 1994), et leur importance est donc modulée par l'activité mitochondriale.

Le potentiel de phosphorylation cytosolique ($\Delta G_{p_{cyto}}$), est généré à partir de ce $\Delta G_{p_{mito}}$ par deux transports électrogéniques, le transport du phosphate (Pi) (échange avec un proton) et l'échangeur ADP/ATP (ANT). Dans les cellules cardiaques, l'ATP produit au cours de la phosphorylation oxydative est exporté dans le cytosol sous forme de phosphocréatine (PCr), du fait de la présence de l'isoforme mitochondrial de la créatine kinase (miCK) ainsi que de la porine (VDAC, pour *Voltage Dependant Anion Channel*) (figure 5).

Le $\Delta G_{p_{cyto}}$, généré par la mitochondrie et la glycolyse, dépend du rapport des principaux métabolites phosphorylés mis en jeu dans la réaction d'hydrolyse de l'ATP (équation 1.1).

$$\Delta G_{p_{cyto}} = \Delta G_0 + R \cdot T \cdot \ln \frac{[ADP] \cdot [Pi] \cdot [H^+]}{[ATP]} \quad (1.1)$$

La composante du ΔG_p liée aux concentrations des métabolites phosphorylés est connectée aux concentrations de créatine et PCr cytosoliques par la navette Phosphocréatine-Créatine Kinase (PCr-mbCK) (Jacobus and Lehninger 1973, Meyer et al. 1984, Wallimann et al. 1992) (figure 6). Le fonctionnement de cette navette, basé sur une compartimentation sub-cellulaire de la créatine kinase, facilite le transport de l'énergie, sous forme de potentiel phosphate, des sites de production (chaîne respiratoire mitochondriale et glycolyse) aux sites d'utilisation (ATPases myofibrillaires et ioniques) (figure 6) (Wallimann et al. 1992).

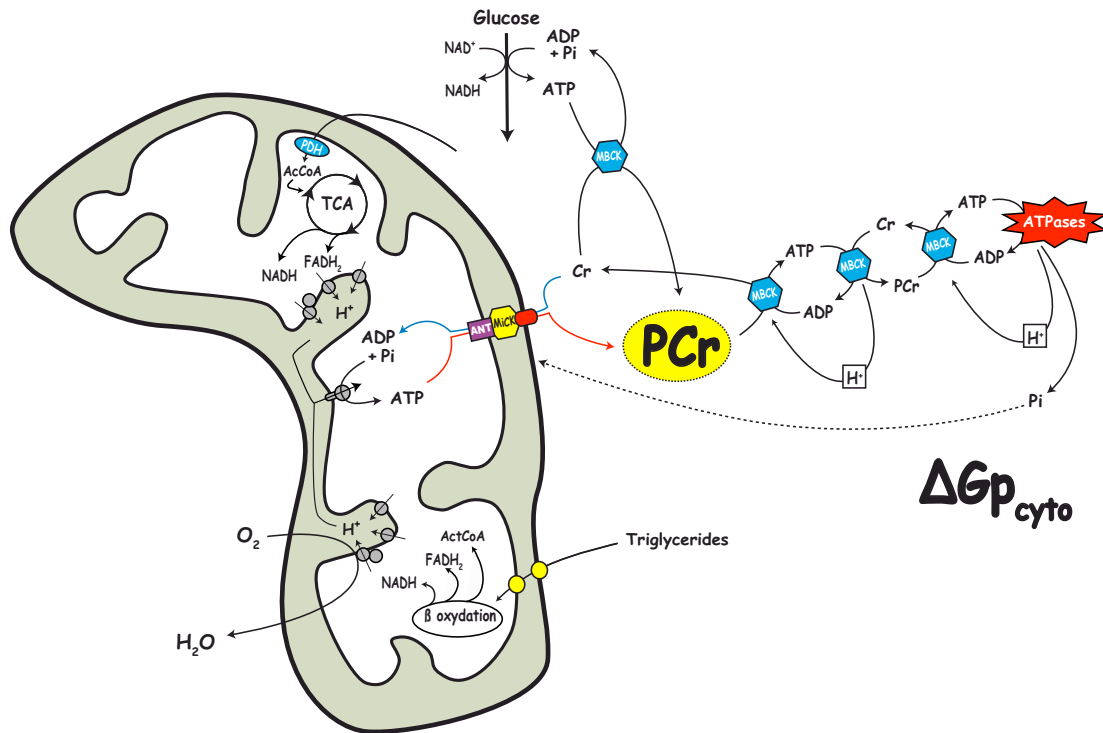


FIG. 6 – La phosphocréatine (PCr) métabolite central de l'énergétique musculaire
L'existence de la navette Phosphocréatine / Créatine Kinase, facilite le transport de
l'énergie des sites de production aux sites d'utilisation.

Le système des CK cytosoliques relie la production d'ATP à la demande énergétique en couplant le transfert d'énergie (sous forme de PCr), depuis les sites de production jusqu'aux sites d'utilisation, avec le transfert d'un signal sous forme de créatine en retour (Wallimann et al. 1992) (figure 6).

Le fonctionnement du système CK-PCr assure ainsi le contrôle local des concentrations d'ADP et d'ATP, et garantit l'efficacité cinétique des ATPases. En effet, le maintien d'un rapport en faveur d'un ΔG_p élevé près de ces ATPases est un contrôle thermodynamique particulièrement important, notamment pour les enzymes couplées à des gradients ioniques réversibles comme l'ATPase du réticulum sarcoplasmique. De plus, le transfert par la créatine kinase du groupe phosphate entre l'ATP et la PCr s'effectue à un taux ≈ 10 fois plus important que le taux de synthèse d'ATP par la phosphorylation oxydative (Bittl and Ingwall 1985), ce qui permet de considérer la réaction de la CK comme étant proche de l'équilibre. Pour cette raison, ce système agit comme un mécanisme "tampon" de l'ATP cellulaire et fait de la concentration de PCr (ou plus exactement du rapport $[PCr]/[Cr]$) un paramètre représentatif du ΔG_p (figure 6). La PCr assume donc un véritable rôle d'intermédiaire énergétique connecté au ΔG_p en reliant les sites de production et d'utilisation d'énergie, à travers la compartimentation des isoformes de créatine kinase (Wallimann et al. 1992).

1.3.1.2 Couplage Excitation-Contraction

Les mouvements calciques jouent un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction (figure 7), en particulier dans le cas du coeur dont l'activité contractile est constante.

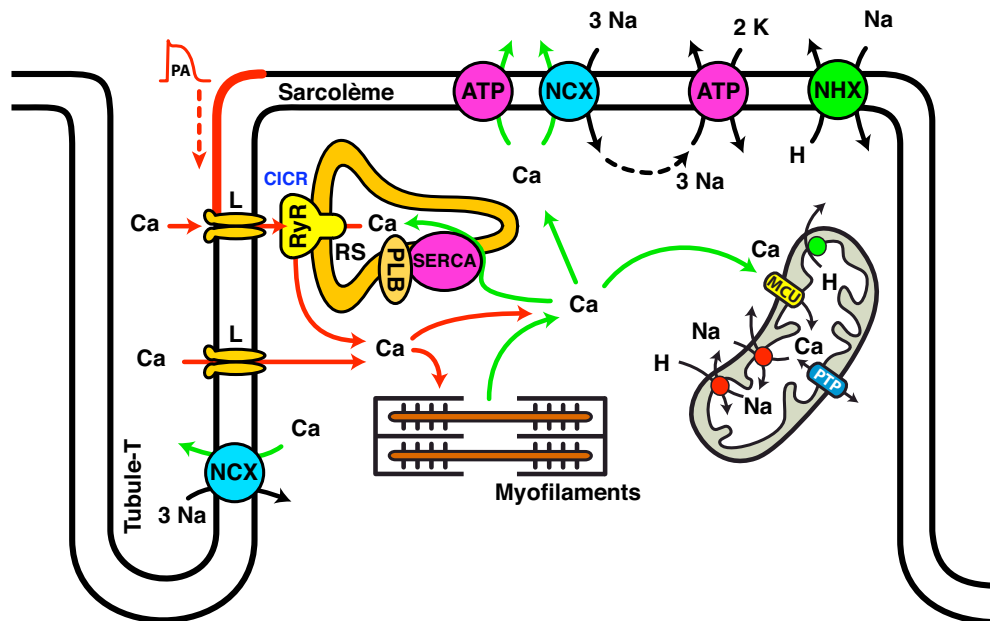


FIG. 7 – *Couplage excitation-contraction*. Ca, calcium. PA, potentiel d'action. RS, réticulum sarcoplasmique. CICR, mécanisme de larguage du calcium par le RS en réponse à une augmentation calcique locale. RyR, récepteur à la ryanodine. L, canaux calciques de type L. SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. PLB, phospholambane. NCX, échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. MCU, uniporteur calcique mitochondrial. PTP, pore de transition mitochondriale. (Figure inspirée de (Bers 2002))

Le couplage excitation-contraction est défini comme l'ensemble des processus qui conduisent à l'activation des protéines contractiles à partir d'une dépolarisation membranaire. L'état initial est souvent considéré comme la cellule au repos, caractérisée par une concentration calcique très basse (100 nM) dans le cytoplasme. L'arrivée d'un potentiel d'action (PA) va entraîner une vague de dépolarisation propagée sur tout le sarcolemme, et notamment dans ses invaginations, les tubules T (figure 7). La membrane de ces derniers, contient des canaux calciques de type L, dont l'ouverture, résultante de la dépolarisation membranaire, va induire l'augmentation du calcium dans le cytoplasme des cardiomyocytes (figure 7). Cette entrée de Ca^{2+} n'est pas suffisante pour activer les protéines contractiles, mais va déclencher l'ouverture du récepteur à la ryanodine (RyR) - le canal calcique du réticulum sarcoplasmique (RS) - par un mécanisme auto-catalytique appelé CICR (*Calcium-Induced Calcium-Release*) (figure 7). Ce mécanisme d'amplification permet d'atteindre localement une concentration calcique qui avoisine 1 μM , ce qui va permettre la contraction musculaire. Cette augmentation de concentration calcique va également jouer un rôle dans l'ajustement de l'activité mitochondriale à l'augmentation de la demande énergétique (Ba-

laban 1990, Cortassa et al. 2003, Diolez et al. 2007). En effet, une fois rentré dans la mitochondrie par l'uniport calcique (MCU) (figure 7), le calcium va activer l'activité de certaines déshydrogénases du cycle de Krebs (Denton et al. 1978, McCormack and Denton 1979, Denton et al. 1980).

La diminution rapide de la concentration calcique permet ensuite la relaxation du myocyte. Selon l'espèce, 80 % à 90 % du Ca^{2+} systolique est recapté dans le RS par des pompes calciques ATP dépendantes (SERCA, *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPases*) dont l'activité est régulée par la phosphorylation d'une protéine associée, le phospholambane (PLB) (figure 7). Les 10 % à 20 % restants sont sorti de la cellule, majoritairement par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ou par la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique (figure 7). Après sortie du calcium, la pompe Na^+/K^+ -ATPase permet de rééquilibrer la concentration de sodium dans le cytosol (figure 7). Pendant la contraction, le contrôle du pH intracellulaire est assuré par l'activité du transporteur Na^+/H^+ (NHX) qui permet l'élimination des protons (figure 7).

1.3.2 Production d'Énergie et Hypoxie

1.3.2.1 Effets de l'Hypoxie Aigüe

Dans son fonctionnement physiologique normal, le métabolisme énergétique cardiaque repose principalement sur les oxydations phosphorylantes mitochondriales (Balaban 1990). Le coeur est ainsi un des organes les plus oxydatifs, et bien qu'il ne représente que 0,4 % du poids corporel total, il est responsable de près de 11 % de la consommation d'oxygène globale du sujet (Rolfe and Brown 1997). Le métabolisme énergétique cardiaque est donc particulièrement affecté par la diminution directe de la PaO_2 . La diminution de l'apport en oxygène limite la respiration mitochondriale (Reimer and Jennings 1986), ce qui diminue de manière importante la production cellulaire d'énergie (Gnaiger 2001). Ceci est par exemple illustré par les travaux de Hütter et al. (1990) qui, après avoir soumis des coeurs isolés travaillants de rat à une anoxie, ont mis en évidence une forte diminution du contenu en ATP dans les mitochondries.

Cette limitation de l'activité de la phosphorylation oxydative implique l'oxydation moins importante des différents substrats, et en particulier celle des acides gras par la β -oxydation, substrat majoritaire des cellules cardiaques. Ceci a pour conséquence une diminution de la carnitine libre et une accumulation intramitochondriale d'acyl-CoA et d'acyl-carnitine à longue chaîne. Ces composés entraînent des altérations membranaires importantes et sont notamment à l'origine d'une inhibition enzymatique de l'ANT (Borutaite et al. 1989, Dhalla et al. 1992) accentuant la baisse de production d'ATP (Dhalla et al. 1992).

1.3.2.2 Effets de l'Hypoxie Chronique

En hypoxie chronique, des mécanismes adaptatifs se mettent en place, le métabolisme énergétique cardiaque étant alors fortement modifié (Essop 2007, Ostadal and Kolar 2007). Ceci se reflète par une modification de l'expression et de l'activité des protéines impliquées dans l'énergétique et les différentes voies métaboliques du coeur.

Ainsi, l'hypoxie chronique induit une diminution de la capacité de phosphorylation oxydative des cellules du myocarde (Nouette-Gaulain et al. 2005). Cette baisse de la capacité de synthèse mitochondriale d'ATP est expliquée à la fois par une diminution de la masse mitochondriale (montrée par diminution de l'activité de la citrate synthase) et par une réduction moyenne de plus de 30 % de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale (Nouette-Gaulain et al. 2005). Cette modification affecte différemment les deux ventricules. Après 14 jours d'hypoxie chronique hypobare ces effets sont déjà observés dans le ventricule gauche (Nouette-Gaulain et al. 2005). Ce n'est qu'après 21 jours d'acclimatation et une hypertrophie totalement développée que l'altération mitochondriale est aussi constatée dans le ventricule droit (Nouette-Gaulain et al. 2005). Cette différence d'évolution entre les deux ventricules pourrait s'expliquer par des processus d'accroissement de la capacité oxydative liés au développement du myocarde droit (hypertrophie) qui permettrait un maintien de la capacité oxydative en compensant les effets délétères de la privation d'oxygène, de ce fait observés plus précocement dans le ventricule gauche.

Une augmentation de l'expression des UCP2 dans les deux ventricules a également été mesurée sur mitochondries de coeur de rat à partir de 14 jours d'hypoxie chronique, tandis que l'expression des UCP3 semble diminuer (Zungu et al. 2007; 2008). L'impact de ces modifications sur les fuites de protons n'est pas clairement défini, puisqu'une augmentation des fuites de protons n'est mesurée que dans le ventricule gauche (Zungu et al. 2008). Ce résultat pourrait impliquer un mécanisme de diminution du potentiel membranaire pour diminuer le taux de réduction des quinones et donc limiter la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) (Brand and Esteves 2005).

Cette altération de l'énergétique mitochondriale joue certainement un rôle majeur dans la diminution du contenu cellulaire en PCr observée durant le processus d'adaptation à l'hypoxie chronique (Rossi and Lortet 1996, Novel-Chaté et al. 1995; 1998), modification à l'origine de la baisse du rapport PCr/ATP. L'activité totale de la créatine kinase est également altérée lors de l'adaptation à l'hypoxie chronique (Field et al. 1994, Pissarek et al. 1997, Novel-Chaté et al. 1998) et cette diminution est accompagnée par une modification du profil de répartition des différentes isoformes (Field et al. 1994, Pissarek et al. 1997, Novel-Chaté et al. 1998). Ainsi, après trois semaines d'hypoxie, on constate sur le coeur une augmentation relative de l'expression de la créatine kinase cytosolique (Field et al. 1994, Pissarek et al. 1997). En ce qui concerne la créatine kinase mitochondriale, une réduction d'activité n'est observée que dans

le ventricule gauche (Pissarek et al. 1997, Novel-Chaté et al. 1998), suggérant une adaptation plus particulière de cet isoforme avec le développement de l'hypertrophie droite. Le lien que pourrait avoir cette altération du système PCr / CK avec une possible diminution de ΔG_p après hypoxie chronique reste cependant à déterminer.

L'altération de la capacité oxydative cardiaque s'accompagne d'une réorientation du métabolisme cardiaque, avec diminution de l'oxydation préférentielle des acides gras au profit de l'oxydation des substrats carbohydratés (Bishop and Altschuld 1970, Leverve 1998). Plusieurs études montrent une atteinte précoce du métabolisme des acides gras lors de l'adaptation à l'hypoxie chronique, quel que soit le modèle d'étude (Rumsey et al. 1999, Daneshrad et al. 2000, Nouette-Gaulain et al. 2005). Cette altération se caractérise par une diminution de la capacité d'oxydation des acides gras, montrée par exemple par une diminution de la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (β -HAD, enzyme de la β -oxydation) lors de l'adaptation à l'hypoxie chronique (Daneshrad et al. 2000). Les mécanismes de diminution de la capacité d'oxydation des acides gras lors de l'adaptation à l'hypoxie chronique semblent toutefois plus complexes que la seule atteinte de l'activité de la β -oxydation par diminution de l'oxygène disponible pour les mitochondries et pourraient également impliquer une altération du transport des acides gras à longue chaîne liée à la modification anatomique cardiaque développée. En effet, dans le cas d'une hypertrophie sévère sans hypoxie, Christian et al. (1998) ont mis en évidence une diminution de l'oxydation des acides gras à longue chaîne, celle-ci paraissant secondaire à l'altération de la fonctionnalité de la membrane externe mitochondriale et à la mauvaise synchronisation des activités enzymatiques de la palmitoyl-CoA synthase et de la CPT₁.

Parallèlement à la diminution de la capacité d'oxydation des acides gras, les mécanismes d'adaptation de la cellule cardiaque à l'hypoxie favorisent l'expression des enzymes impliquées dans la glycolyse (van Bilsen et al. 2004). Les augmentations les plus significatives concernent les activités de l'hexokinase et de la lactate déshydrogénase avec des augmentations respectives de 100 % et 50 % (Daneshrad et al. 2000). La production énergétique anaérobie via la glycolyse permettrait alors d'augmenter la quantité d'ATP phosphorylé pour une plus faible consommation d'O₂ (van Bilsen et al. 2004), optimisant ainsi le fonctionnement énergétique du myocarde malgré les conditions défavorables en oxygène (Korvald et al. 2000). Dans le même sens, après deux semaines d'hypoxie chronique, une augmentation de 50 % de l'expression de GLUT-1, considéré comme le principal responsable du transport non insulino-dépendant du glucose, est observé sur le coeur de rat (Sivitz et al. 1992). La surexpression des enzymes glycolytiques et de GLUT-1 est expliquée par l'activation des facteurs de transcription *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) suite à la baisse d'oxygène (Wright et al. 2003). De plus, l'activation de ce facteur de transcription induit la transcription de nombreux gènes dont des gènes de facteurs angiogéniques, comme le *Vascular Endothelium Growth Factor* (VEGF) ou l'angiopoïétine-2 (Pugh and Ratcliffe 2003), ou encore stimule la production érythropoïétique, ce qui favorise le développement

du réseau capillaire et optimise ainsi l'apport d'O₂ aux cellules dans les conditions défavorables d'hypoxie chronique.

1.3.3 Consommation d'Énergie et Hypoxie

1.3.3.1 Effets de l'Hypoxie Aigüe

Des études cliniques ont révélé que lors des ischémies myocardiques transitoires propres à certaines opérations chirurgicales, les myocytes de la région ischémiée présentaient une contractilité réduite par rapport aux myocytes de la zone non ischémiée (Schwarz et al. 1998, Wiggers et al. 2001). Ainsi, l'exposition du muscle cardiaque à une hypoxie aigüe résulte en une baisse d'activité et de consommation d'oxygène, dans un phénomène appelé "hibernation myocardique" (Braunwald and Rutherford 1986, Marban 1991, Heusch and Schulz 1996, Budinger et al. 1998). Ces observations expérimentales suggèrent qu'une diminution de la production énergétique - ici induite par l'inhibition directe de l'énergétique mitochondriale par la baisse d'O₂ (Gnaiger et al. 1995, Gnaiger 2001) - est en mesure de compromettre indirectement l'activité des ATPases myofibrillaires.

La compréhension de ce phénomène requiert la considération de l'énergétique cardiaque en processus qui produisent et qui consomment de l'ATP (Ingwall and Weiss 2004).

Comme nous l'avons vu dans la sous-section 1.3.1, l'état énergétique du coeur n'est pas défini par la concentration en ATP ou de PCr présente dans les cellules cardiaques mais par le ΔG_p , dont la valeur dépend de la concentration de tous les intermédiaires énergétiques mis en jeu dans la réaction de l'hydrolyse de l'ATP. Le rapport ($[ATP]/[ADP].[Pi]$) est ainsi une composante importante de l'énergie libre disponible à partir de l'hydrolyse de l'ATP (ΔG_p) pour le fonctionnement des processus consommateur d'ATP.

Lors de l'hypoxie, la diminution de l'oxygène, substrat du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (figure 5), induit une diminution de la respiration mitochondriale (Reimer and Jennings 1986), pouvant conduire à une diminution du ΔG_p cellulaire (Gnaiger 2001). En conditions normoxiques, ce ΔG_p est de l'ordre de $-59 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ dans les cardiomyocytes. En couplant des expériences RMN sur coeur isolé-perfusé de rat à des mesures biochimiques, Kammermeier et al. (1982) ont montré que lors d'une hypoxie progressive, en dessous de certaines valeurs de ΔG_p , plusieurs enzymes, comme les SERCA ($-52 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) ou les pompes Na^+/K^+ -ATPase ($-46 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), voient leur activité fortement diminuer.

Il existe ainsi dans les cellules une hiérarchie dans les processus consommateurs d'ATP (ou d'énergie), en fonction de leur sensibilité à une baisse du ΔG_p . Ceci a clairement été démontré par Buttgerit and Brand (1995) qui ont établi la hiérarchie complète des processus consommateurs d'ATP dans des thymocytes. Par exemple, sur ce modèle, la synthèse des protéines et des polynucléotides est particulièrement sensible à une diminution du ΔG_p , et une inhibition de 60 % de leur activité est

observée en réponse à une réduction de 30 % de l'activité respiratoire par addition d'un inhibiteur du complexe III (myxothiazol) (Buttgereit and Brand 1995). Dans le coeur, une forte sensibilité de la synthèse protéique et des ATPases ioniques à une diminution de ΔG_p cellulaire pourrait expliquer la très forte inhibition de leur activité mesurée dès les premières minutes d'hypoxie (Kammermeier et al. 1982, Hochachka 1986, Hochachka et al. 1996, Boutilier and St-Pierre 2000). Les ATPases myofibrillaires semblent aussi affectées par cette diminution de l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP dans le cytosol, comme le montre la diminution de la contractilité dès le début de l'hypoxie (Marban 1991, Kammermeier et al. 1982, Budinger et al. 1998, Ingwall and Weiss 2004).

1.3.3.2 Effets de l'Hypoxie Chronique

L'hypoxie chronique implique des changements qualitatifs au niveau du matériel contractile dans les deux ventricules (Pissarek et al. 1997). La modification du profil de répartition des types de myosines, avec l'augmentation de l'expression des myosines "lentes", pourrait permettre de réduire le coût de la contraction en développant un même travail pour une plus faible consommation d'énergie (Pissarek et al. 1997). L'impact d'une plus grande expression de myosine lentes sur le ΔG_p a récemment été montré sur coeur isolé perfusé de souris par Hoyer et al. (2007) : en effet, un ΔG_p toujours plus important est mesuré sur des souris transgéniques dont la proportion des types de myosine lente a été augmentée (95 % $\alpha\alpha$ -MyHC / 5 % $\beta\beta$ -MyHC \rightarrow 17 % $\alpha\alpha$ -MyHC / 83 % $\beta\beta$ -MyHC), quelle que soit l'intensité de travail imposé (Hoyer et al. 2007). La modification du profil de répartition des types de myosines observée durant l'adaptation à l'hypoxie chronique (Pissarek et al. 1997) pourrait donc compenser la diminution du ΔG_p induite par l'hypoxie et permettre ainsi de limiter la diminution de la contraction.

1.3.4 Altération de la Gestion Calcique

1.3.4.1 Effets de l'Hypoxie Aigüe

Au cours de l'hypoxie, la diminution du ΔG_p inhibe la pompe Na^+/K^+ -ATPase, ce qui conduit à une augmentation intracellulaire de sodium et à une accumulation de potassium à l'extérieur des cellules. D'autre part, l'acidose active l'échangeur NHX, induisant elle aussi une accumulation intracellulaire de sodium. Cette surcharge sodique est associée à une entrée d'eau qui peut être responsable d'un oedème intracellulaire si la durée d'hypoxie se prolonge. De plus, ce gradient anormal de sodium conduit à l'inversion de l'échangeur NCX, provoquant une entrée de calcium dans les cellules. L'augmentation progressive de la concentration calcique intracellulaire entraîne des dysfonctions au niveau des protéines contractiles, impliquant ainsi le développement d'une contracture hypoxique à partir de quelques dizaines de minutes. La diminution du ΔG_p provoque également l'ouverture des canaux potassiques ATP-

dépendants (fermés quand le ΔG_p est élevé), ce qui entraîne une accumulation de potassium à l'extérieur de la cellule. Celle-ci est à l'origine des perturbations électrophysiologiques observées au cours de l'hypoxie aiguë (Vleugels et al. 1980).

1.3.4.2 Effets de l'Hypoxie Chronique

Sur cardiomyocyte isolé de rat adaptés à l'hypoxie chronique, Pei et al. (2000) ont montré une diminution de l'amplitude des transients calciques après induction d'une stimulation électrique. Cette modification semble être la conséquence d'une altération de l'ensemble de la gestion calcique par les cardiomyocytes. En particulier, le contenu calcique du réticulum sarcoplasmique est diminué dès 2 semaines d'exposition à l'hypoxie, sans que cela n'affecte la concentration calcique dans le cytosol (Pei et al. 2003). Une diminution de l'activité et de l'expression des protéines SERCA et du RyR, ainsi que de l'activité de l'échangeur NCX du sarcolème sont également observés (Pei et al. 2003). Ces modifications sont à l'origine d'une diminution du largage/repompage du calcium dans les cardiomyocytes (diminution de l'amplitude des transients calciques), ce qui a d'importantes conséquences sur la fonction d'excitation - contraction avec notamment une diminution de la contractilité (Pei et al. 2003).

De par le rôle majeur du calcium dans l'activation des processus de la production énergétique (Balaban 1990, Cortassa et al. 2003, Diolez et al. 2007, Griffiths and Rutter 2009, Balaban 2009), cette modification de la gestion calcique en hypoxie chronique est susceptible d'affecter directement l'ensemble du système énergétique cardiaque.

1.4 CONCLUSION

Dans le coeur, l'acclimatation à l'hypoxie chronique est donc responsable d'un grand nombre de modifications énergétiques et métaboliques complexes affectant l'ensemble des processus impliqués dans la production, le transfert ou la consommation d'énergie. Un des enjeux de la compréhension des mécanismes intimes des réactions physiologiques en réponse à l'hypoxie chronique est la détermination de leur retentissement sur la fonction cardiaque intégrée. Les répercussions globales des modifications induites par l'hypoxie chronique sur l'énergétique cardiaque ne sont pas encore bien définies et leur étude nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux et théoriques intégratifs.

L'approche intégrative développée au sein du laboratoire par notre équipe (équipe CMFC, *Contrôle Métabolique de la Fonction Contractile*), l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA) (Diolez et al. 2002; 2007), peut permettre une meilleure compréhension de ces adaptations cardiaques à l'hypoxie chronique. Cette approche permet en effet une description quantitative de l'ensemble des interactions au sein d'un système biologique complexe. L'application d'une telle approche sur organe entier représente un outil puissant pour l'étude des interactions au sein de l'énergétique

cardiaque, normale ou pathologique, et a déjà permis une meilleure compréhension du rôle complexe du calcium dans la bioénergétique cardiaque ([Diolez et al. 2002](#); [2007](#)).

ÉTUDE INTÉGRÉE DE L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE

2

SOMMAIRE

2.1	VERS UNE BIOLOGIE DES SYSTÈMES	31
2.2	ANALYSE MODULAIRE DU CONTRÔLE MÉTABOLIQUE	32
2.2.1	Notion de Voie Métabolique, de Flux et de Contrôle	32
2.2.2	Décomposition d'un Système en Modules	33
2.2.3	Détermination Expérimentale des Elasticités	35
2.2.4	Calcul des Coefficients de Contrôles sur le Flux	37
2.2.5	Analyse de Régulation	38
2.3	APPLICATION À L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE	39
2.3.1	Description de l'Énergétique Cardiaque en Modules	40
2.3.2	Légitimité et Limites du Modèle	41
	CONCLUSION	44

LA Biologie des Systèmes est une démarche nouvelle qui a pour objectif d'étudier le fonctionnement d'un organisme vivant en assimilant les réseaux d'interactions biologiques à des systèmes modélisables. Ce courant combine des approches expérimentales et théoriques afin de comprendre comment les différentes parties d'un organisme fonctionnent et interagissent entre elles. Cependant il ne s'agit pas de considérer tour à tour les éléments puis leurs interactions mais au contraire de s'intéresser à la résultante de l'interaction des éléments. En effet, dans les systèmes complexes, le phénomène d'*émergence* évoque la naissance de nouvelles propriétés à partir de l'organisation des différents éléments de ce système (*ex* : fonction d'un organe, comme la contraction cardiaque qui naît de l'interaction des différents éléments de l'énergétique cardiaque). C'est un tout non dissociable aux caractéristiques de ses parties.

À la vue des nombreuses modifications touchant l'ensemble des processus de production et de consommation d'énergie dans le cœur lors de l'adaptation à l'hypoxie chronique, l'application d'une approche intégrative devrait permettre une meilleure

compréhension des mécanismes physiologiques mis en jeu ainsi que de leur retentissement global sur l'énergétique cardiaque.

2.1 VERS UNE BIOLOGIE DES SYSTÈMES

La nécessité d'élaborer et de mettre en oeuvre des méthodes permettant une compréhension approfondie et une modélisation prédictive cohérente, fiable et précise des systèmes biologiques est devenue une évidence tant les enjeux économiques qui y sont liés sont importants. Cela s'applique tout aussi bien au niveau industriel (pharmacologie, agro-alimentaire et environnement, ...) qu'au niveau public (santé, recherche, ...).

C'est dans ce contexte qu'est née la **Biologie des Systèmes** ("Systems Biology") ou **Biologie Intégrative**. Elle peut être définie comme *"la science qui vise à comprendre comment une fonction biologique, absente des macromolécules isolées, survient quand ces dernières sont des composants d'un système"* (Westerhoff et al. 2009). Ces propriétés qui émergent en résultat de l'interaction des composants d'un système, sont dépendantes du niveau d'organisation de ce système. Le phénomène d'émergence est lié à l'intégration, et explique pourquoi (i) on ne peut pas forcément prédire le comportement de l'ensemble par la seule analyse de ses parties ("réductionnisme"), et pourquoi (ii) l'ensemble adopte un comportement caractérisable sur lequel la connaissance détaillée de ses parties ne renseigne pas complètement (Weiss et al. 2006). Toutefois, ces nouvelles propriétés n'apparaissent qu'à partir d'un certain seuil de complexité, et ne deviennent observables que lorsqu'elles vont dans le sens d'une organisation nouvelle et globale. Ainsi, le tout n'est pas uniquement de reconstruire des réseaux biologiques, mais de comprendre leurs propriétés, notamment dynamiques (Weiss et al. 2006). Cette insistance sur l'aspect dynamique des systèmes biologiques est souvent considérée comme la marque distinctive de la Biologie des Systèmes et de son apport majeur. Ceci est mis en valeur par Kitano (2002) dans ce qui est considéré par certains comme le manifeste de ce courant de pensée : *"La compréhension systémique, l'approche défendue en Biologie des Systèmes, exige un déplacement dans notre idée de ce qu'il faut chercher en biologie. Si une compréhension en termes de gènes et de protéines continue d'être nécessaire, l'important est de comprendre la structure et la dynamique d'un système. Parce qu'un système n'est pas un simple assemblage de gènes et de protéines, ses propriétés ne peuvent être complètement comprises simplement en dessinant les diagrammes et leurs interconnexions"*.

Le coeur est un des premiers organes pour lequel se sont déployés des efforts de modélisation et simulation avec le développement des premiers modèles des potentiels d'action dans les années 1960 (Hutter and Noble 1960, Hall et al. 1963). Aujourd'hui, l'engouement pour la compréhension globale de cet organe est toujours aussi grand, et des projets visant à la construction d'un véritable *Coeur Virtuel* sont en cours. L'un des projets les plus importants est notamment développé dans le cadre du *Physiome Project* (www.physiome.org.nz/projects/cardiovascular/) (Hunter et al. 2002) sous l'impulsion de Peter Hunter (Université d'Auckland) et Denis Noble (Université d'Oxford). Le succès de tels challenges scientifiques dépend étroitement de la connaissance et de la compréhension des mécanismes physiologiques à tous les

niveaux, ce qui inclut notamment le métabolisme énergétique (Noble 2002; 2006, Bas-singthwaighe et al. 2009).

Le réseau métabolique cellulaire, avec ses innombrables ramifications, ses rétroactions, sa régulation, ses compartiments et les échanges entre eux, est actuellement très loin de pouvoir donner lieu à une modélisation explicite. Quand bien même celle-ci serait possible, un vaste champ d'investigation resterait ouvert. En raison du phénomène d'émergence, il n'est ni nécessaire, ni suffisant, de connaître *tous* les éléments d'un système pour en étudier et comprendre certaines propriétés. C'est sur cette base épistémologique que s'est construite la *Théorie du Contrôle Métabolique*, qui, depuis plus de 30 ans maintenant, apporte des concepts extrêmement utiles dans le contexte de la Biologie Intégrative. Fondée indépendamment en 1973-74 par une équipe allemande (Kacser and Burns 1973) et une équipe écossaise (Heinrich and Rapoport 1974), elle a depuis fait l'objet de nombreux travaux, en particulier pour l'étude des fonctions mitochondriales telles que la β -oxydation (Quant 1993, Quant et al. 1993, Quant and Makins 1994) ou la phosphorylation oxydative (Hafner et al. 1990, Kes-seler et al. 1992, Diolez et al. 1993, Brand 1998, Leducq et al. 2002, Gouspillou et al. 2010). Aujourd'hui, les concepts de l'Analyse du Contrôle Métabolique sont de plus en plus utilisés en vue de l'étude de pathologies, et leur application semble particulièrement adaptée pour la détermination de cibles thérapeutiques et le développement de nouvelles drogues (Cascante et al. 2002, Hornberg et al. 2007, Cascante and Marin 2008).

2.2 ANALYSE MODULAIRE DU CONTRÔLE MÉTABOLIQUE

2.2.1 Notion de Voie Métabolique, de Flux et de Contrôle

Une **voie métabolique** est une séquence de réactions biochimiques catalysées par des enzymes, au cours de laquelle une même molécule (*substrat initial*) est modifiée jusqu'à l'obtention d'un *produit final*. C'est donc un système thermodynamique ouvert que traverse un flux de molécules : les molécules de substrats sont transformées en molécules de produit par une série de réactions produisant des molécules intermédiaires ($Substrat \xrightarrow{Enzyme} Intermédiaire \xrightarrow{Enzyme} Produit$), ce qui génère un **flux métabolique au travers de la voie**. Lorsque le flux est constant, toutes les enzymes sont traversées par ce même flux et donc catalysent les réactions à la même vitesse. Le système est ainsi à l'*état stationnaire*, caractérisé par des concentrations d'intermédiaires constantes puisque les vitesses de réaction de toutes les enzymes sont égales (les vitesses de production et de consommation de l'intermédiaire sont égales).

Puisqu'une voie métabolique est une suite de réactions enzymatiques, historiquement, les premières études biochimiques de ces voies ont consisté à envisager chacune des réactions individuelles, et donc à déterminer les caractéristiques *in vitro* de chacune des enzymes ("*Approche Réductionniste*"). Ceci aboutissait à la construction d'un

modèle intuitif de la voie considérée, avec le plus souvent la détermination d'une *étape limitante* (figure 8).

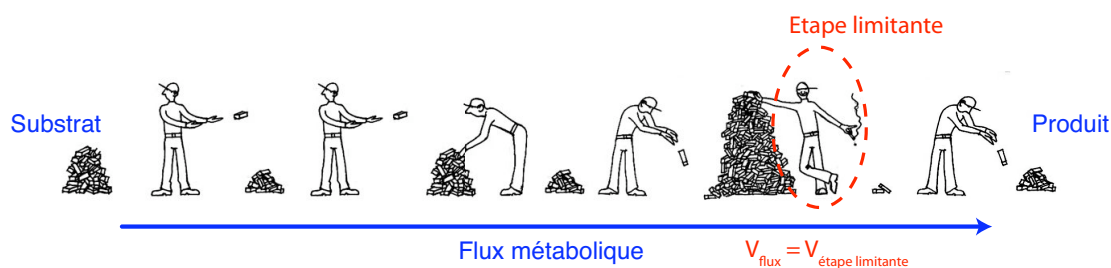


FIG. 8 – *Étude du contrôle d'une voie métabolique par détermination de l'étape limitante.* Dans le concept de l'étape limitante, le flux de la voie métabolique est fixé par le niveau d'activité de l'étape limitante.

Dans un tel schéma, le flux d'une voie métabolique est alors fixé par les propriétés de l'enzyme correspondant à cette étape limitante. En d'autres termes, on peut dire que le flux de la voie métabolique est alors entièrement "contrôlé" par la vitesse de réaction de l'étape limitante (figure 8). Une des conséquences de ce modèle est que toute augmentation de l'activité de l'enzyme contrôlant la voie doit se répercuter par une augmentation de même proportion de la production du produit final de cette voie.

L'ingénierie biologique s'est intéressée à ce principe, dans le but de pouvoir augmenter les productions de certains composés organiques. Cependant, les différentes tentatives de contrôle de la production de matériel biologique ont pour la plupart donné des résultats décevants voire étonnants puisque dans certains cas l'effet contraire à ce qui était désiré fut observé. Un des exemples marquants a été la tentative d'augmentation de la production d'amidon par des pommes de terre via la surproduction d'enzymes de la voie de synthèse de l'amidon, qui au final provoqua la diminution de la taille des pommes de terres (Leggewie et al. 2003).

Ces données expérimentales suggèrent ainsi que, dans une voie métabolique, le modèle considérant l'existence d'une étape catalysée par une enzyme dont les propriétés détermineraient le comportement cinétique de l'ensemble du système n'est pas entièrement satisfaisant. Dans ce contexte, la théorie du Contrôle Métabolique, représente un nouveau cadre de référence. Son apport principal a été de considérer que le contrôle peut être partagé par l'ensemble des enzymes d'une voie métabolique, et non pas dévolu à une seule étape.

2.2.2 Décomposition d'un Système en Modules

La théorie du Contrôle Métabolique peut être appliquée à tout système à partir du moment où ce dernier (i) peut être défini par différents modules communicants (ex : système à 2 modules connectés par un intermédiaire commun) et (ii) est traversé par un flux identifiable. La définition du système en modules indépendants sous-

entend que chaque module est une entité unique isolée et que les modules ne peuvent donc communiquer entre eux que par les modifications d'intermédiaire (puisque aucun constituant d'un module ne fait également partie d'un autre module). Dans le cas d'une voie métabolique, les modules peuvent par exemple correspondre à des enzymes isolées, ou à des groupes d'enzymes (chaque groupe étant alors considéré comme étant un seul module). Chaque enzyme ne peut faire partie que d'un seul module, l'intermédiaire étant ainsi le substrat/produit de cette enzyme (ou groupes d'enzymes).

L'application de l'Analyse du Contrôle Métabolique donne accès à la façon dont les changements d'activité des enzymes (ou groupe d'enzymes) se traduisent par un changement de flux et d'intermédiaires à travers cette voie. Plus la modification de l'activité d'une enzyme (ou d'un groupe d'enzyme dans un module) aura un impact important sur le flux métabolique du système, plus cette enzyme aura ce que l'on appelle du *contrôle sur le flux*. Il en va de même dans un système décomposé en modules, où chaque module sera caractérisé par un coefficient de contrôle sur le flux du système (Brown et al. 1990, Brand 1996), ce qui correspond à la quantification de la variation relative du flux induite par une variation relative de l'activité d'un module. Cette vision du système en différents modules nous permet alors de parler d'*Analyse Modulaire du Contrôle*.

Dans le cas le plus simple, la voie métabolique étudiée est décomposée en deux modules liés par un intermédiaire commun (figure 9) :

- un module qui produit cet intermédiaire (*module Producteur*)
- un module qui consomme cet intermédiaire (*module Consommateur*)

Comme nous l'avons vu précédemment, en état stationnaire, le flux qui traverse le système correspond au flux qui traverse chacun des modules. Chaque module ayant la même activité, la concentration de l'intermédiaire ($[M]$) est constante. Cet état stationnaire peut être illustré par le point de rencontre des cinétiques de chacun des modules en fonction de la concentration d'intermédiaire ($[M]$), seul point pour lequel les activités des 2 modules sont égales et l'intermédiaire constant (figure 9). L'état stationnaire dépend donc directement des cinétiques des 2 modules. A partir de la figure 9, on comprend ainsi que toute légère variation de $[M]$ provoquera une modification d'activité de sa production et de sa consommation qui tendront toutes les deux à ramener $[M]$ à sa valeur initiale (figure 9). Ainsi, en état stationnaire, le système est caractérisé par deux variables (figure 9) :

- le flux métabolique traversant l'ensemble du système
- la concentration de l'intermédiaire ($[M]$)

L'objectif de l'Analyse Modulaire du Contrôle est de décrire l'établissement et le maintien de cet état stationnaire en intégrant les propriétés cinétiques de chacun des modules dans la description du comportement global du système (flux).

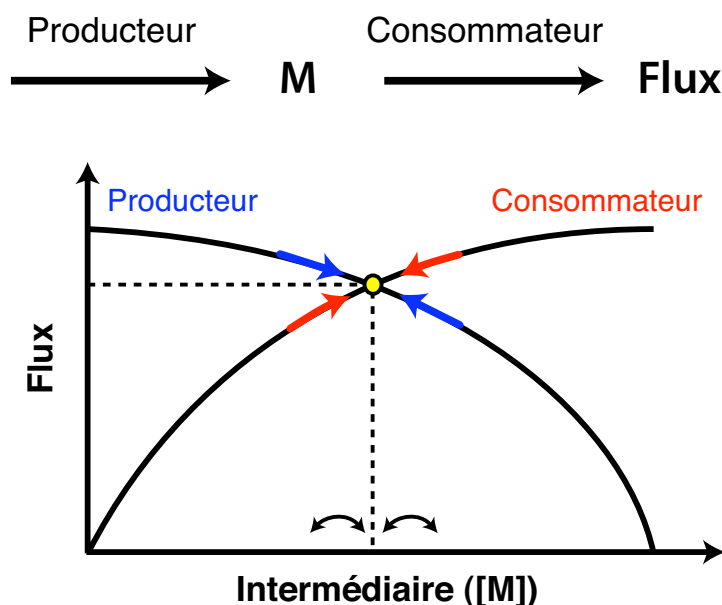


FIG. 9 – *Maintien de l'état stationnaire par les cinétiques des modules.* Un système linéaire composé de deux modules, Producteur et Consommateur d'un intermédiaire (M) commun, est à l'état stationnaire lorsque l'activité des deux modules est égale. Cet état stationnaire est maintenu par les propriétés cinétiques des modules. Ainsi, si $[M]$ tend à varier et sortir de sa valeur d'équilibre (augmentation ou diminution), les modifications d'activité du Producteur et Consommateur en réponse à cette perturbation auront pour conséquence un retour de M à sa concentration initiale.

2.2.3 Détermination Expérimentale des Elasticités

Les propriétés cinétiques des modules peuvent être caractérisées et quantifiées en considérant le changement d'activité de chacun des modules en réponse à une modification de l'intermédiaire : cette réponse cinétique des modules est appelée *coefficient d'élasticité*, noté $\varepsilon_{\text{intermédiaire}}^{\text{module}}$ (Fell 1992, Brand 1996; 1998). Ce coefficient d'élasticité permet donc de quantifier expérimentalement la réponse cinétique de chacun des modules à un changement d'intermédiaire.

La détermination expérimentale de ces élasticités repose sur la mesure, lors d'un changement d'état stationnaire, des modifications concomitantes de la concentration en intermédiaire et de l'activité du module considéré (Brand 1996; 1998) (figure 10).

Dans ce but, une des stratégies possibles consiste à perturber la concentration de l'intermédiaire en activant ou en inhibant de manière spécifique l'activité métabolique d'un des deux modules. Cette perturbation de la cinétique d'un module permet de changer l'état stationnaire. En effet, en modifiant la cinétique d'un des modules on va croiser la cinétique de l'autre module en un autre point et atteindre ainsi un nouvel état stationnaire (figure 10). Ce nouvel état stationnaire est caractérisé par une nouvelle valeur d'intermédiaire $[M]$ et une nouvelle valeur de flux (figure 10). Puisque ce nouveau point d'état stationnaire décrit un autre point de la cinétique originale du

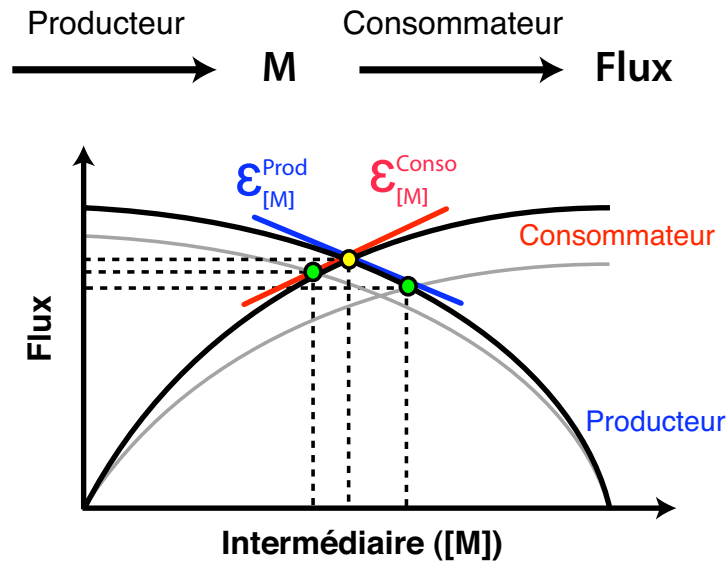


FIG. 10 – *Détermination des coefficients d'élasticité.* Des modifications expérimentales spécifiques de l'activité du module producteur ou consommateur en absence de toute altération de l'activité de l'autre module (cinétiques grises) permet de décrire un second point de la cinétique du module dont on veut déterminer l'élasticité (points verts). L'élasticité correspond graphiquement à la pente relative de la tangente au milieu de l'arc délimité par le point de l'état stationnaire initial (point jaune) et le point du nouvel état stationnaire (points verts).

module auquel on a pas touché, on peut accéder à l'élasticité (réponse cinétique) de ce module. L'élasticité de ce module correspond alors à la pente relative de la tangente à la cinétique de ce module au milieu des deux points décrivant le passage entre les deux états stationnaires (figure 10). Plus cette pente sera importante, plus le module aura une "élasticité" importante, c'est à dire une réponse importante d'activité par rapport à un changement d'intermédiaire.

Cette valeur d'élasticité peut ainsi être calculée par le rapport de la modification relative du flux et de la modification relative de l'intermédiaire (équation 2.1).

$$\epsilon_{\text{intermédiaire}}^{\text{module}} = \frac{\Delta \text{Flux} / \text{Flux}_{\text{initial}}}{\Delta \text{Intermédiaire} / \text{Intermédiaire}_{\text{initial}}} \quad (2.1)$$

A partir de cette équation, on comprend qu'une modification infinitésimale de la concentration d'intermédiaire nous permettra d'accéder au calcul de l'élasticité au point de l'état stationnaire initial. L'objectif expérimental (qui est également une des contraintes et limites expérimentales les plus importantes) est donc de provoquer des modifications de [M] les plus petites possibles afin de pouvoir assimiler la valeur d'élasticité calculée à celle correspondant à l'état stationnaire de référence initial. Expérimentalement, des changements infinitésimaux sont souvent impossibles à obtenir du fait des approximations inhérentes à la mesure (erreur expérimentale). La valeur d'élasticité calculée sera alors considérée comme une approximation de l'élas-

ticité à l'état stationnaire initial. Cependant, dans la plupart des cas, il est possible de confirmer cette valeur d'élasticité (et donc de la valider) en déterminant l'élasticité du module pour une modification expérimentale inverse de l'intermédiaire (c'est à dire en inhibant au lieu d'activer - ou en activant au lieu d'inhiber - l'autre module). L'obtention d'une même valeur d'élasticité permettra de considérer cette valeur comme étant celle correspondant à l'état stationnaire initial.

2.2.4 Calcul des Coefficients de Contrôles sur le Flux

Contrairement aux élasticités qui sont des caractéristiques propres à chacun des modules, les coefficients de contrôle des modules sur le flux énergétique sont des propriétés de l'ensemble de la voie métabolique considérée. De manière générale, un coefficient de contrôle représente une mesure de l'impact d'une modification de l'activité d'un des modules sur le flux à travers le système. Ainsi, si le changement relatif en activité du module est $(\Delta module / module)$, il en résulte un changement de flux relatif $(\Delta Flux / Flux)$. On peut donc calculer ce contrôle à partir du rapport d'une variation relative du flux sur une variation relative de l'activité d'une enzyme : le coefficient de contrôle du module exercé sur le flux (C_{module}^{Flux}) est alors défini par l'équation 2.2 :

$$C_{module}^{Flux} = \frac{\Delta Flux / Flux}{\Delta module / module} \quad (2.2)$$

Ainsi, la somme des coefficients de contrôle de tous les modules d'une voie sur le flux (équation 2.2) peut être décrite par l'équation 2.3 :

$$\sum_{i=1}^n C_{module_i}^{Flux} = \sum_{i=1}^n \frac{\Delta Flux / Flux}{\Delta module_i / module_i} \quad (2.3)$$

On conçoit intuitivement que si la voie métabolique est à l'état stationnaire, et que l'on augmente l'activité de tous les modules par un même facteur, la concentration des intermédiaires de la voie ne sera pas modifiée (les activités de production et de consommation par les modules changent de la même manière). On observera donc un changement du flux total égal au changement de l'activité de chaque module ($\Delta Flux / Flux = \Delta module_i / module_i$). De plus, ce changement de flux peut être considéré comme la somme des changements de flux individuels à travers chacun des modules. En intégrant cette propriété dans l'équation 2.3 on obtient l'équation 2.4, connue sous le nom de **Théorème de Sommation** (Kacser and Burns 1973, Heinrich and Rapoport 1974) :

$$\sum_{i=1}^n C_{module_i}^{Flux} = 1 \quad (2.4)$$

Pour les systèmes linéaires, ce théorème implique que les coefficients de contrôle sur le flux d'une voie sont distribués entre les modules de telle manière qu'il sont

toujours plus petits que 1 ($0 \leq C_{module_i}^{Flux} \leq 1$), et que seul un module pourrait avoir un coefficient de contrôle de 1 (dans ce cas là, ce module serait une véritable étape limitante, tout changement de son activité étant directement traduit par le même changement en flux).

De plus, il existe également un autre lien théorique entre les coefficients de contrôle des modules sur le flux et leurs coefficients d'élasticité par rapport à l'intermédiaire, illustré par le **Théorème de connectivité** (Kacser and Burns 1973, Heinrich and Rapoport 1974). Ce théorème traduit le fait qu'à l'état stationnaire, la somme des effets d'une modification de la concentration de l'intermédiaire sur le flux (au travers de son effet sur chacun des modules) est nulle (équation 2.5). La connectivité exprime donc le fait qu'un effet de l'intermédiaire sur le flux sera la combinaison des effets de l'intermédiaire sur chacun des modules (ces effets étant dépendants de l'élasticité de chacun des modules par rapport à l'intermédiaire, $\varepsilon_{intermediaire}^{module_i}$), et de l'effet de cette modification d'activité des modules (en réponse à l'intermédiaire) sur le flux via le coefficient de contrôle de ces modules sur le flux ($C_{module_i}^{Flux}$). Cela traduit donc que chaque effet de l'intermédiaire sur le flux est le produit d'une élasticité et d'un coefficient de contrôle au travers des modules (équation 2.5).

$$\sum_{i=1}^n C_{module_i}^{Flux} \cdot \varepsilon_{intermediaire}^{module_i} = 0 \quad (2.5)$$

Ces deux théorèmes sous-tendent la théorie du contrôle développée par Kacser and Burns (1973) et Heinrich and Rapoport (1974), et ont par la suite été reformulés en vue de faciliter les applications expérimentales, en particulier pour calculer les coefficients de contrôle à partir des coefficients d'élasticités (Brown et al. 1990). Ceci revient en fait à considérer les équations des deux théorèmes comme un seul système d'équation à deux inconnues.

Ainsi, en considérant par exemple le système linéaire simple décrit dans les figures 9 et 10 (deux modules, Producteur et Consommateur, interconnectés par un intermédiaire M), et en se basant sur les théorèmes 2.4 et 2.5 ci-dessus, les coefficients de contrôle de chacun des modules sur le flux du système peuvent être calculés à partir des élasticités suivant les équations 2.6 et 2.7 suivantes (Brown et al. 1990) :

$$C_{Producteur}^{Flux} = \frac{\varepsilon_{[M]}^{Consommateur}}{\varepsilon_{[M]}^{Consommateur} - \varepsilon_{[M]}^{Producteur}} \quad (2.6)$$

$$C_{Consommateur}^{Flux} = \frac{\varepsilon_{[M]}^{Producteur}}{\varepsilon_{[M]}^{Producteur} - \varepsilon_{[M]}^{Consommateur}} \quad (2.7)$$

2.2.5 Analyse de Régulation

Comme nous venons de le voir, l'analyse du contrôle explique comment les propriétés des variables d'un système (les élasticités des modules) sont responsables du

maintien de l'état stationnaire en absence de variation des conditions extérieures. Cependant, un changement de conditions extérieures, ou l'action d'un effecteur externe est à même d'affecter le système et de modifier son état stationnaire. Dans ces conditions, la *régulation* de l'activité d'un système par un effecteur externe est définie comme le passage du système d'un état stationnaire à un autre sous l'influence d'un effecteur (Brand 1997). Ainsi, les études de régulation s'attachent à la description des bases mécanistiques par lesquelles s'établit un nouvel état stationnaire lorsqu'une voie métabolique est perturbée par son environnement (Brand 1997).

Ainscow and Brand (1999a) ont démontré de manière théorique que la quantification des régulations internes et externes d'un système suite à l'action d'un effecteur (externe) était directement accessible à partir des variables issues de l'analyse des élasticités (élasticités et coefficients de contrôle sur le flux calculés à partir de ces élasticités). Leur première application expérimentale a permis de décrire les réponses de cellules animales à une stimulation hormonale (Ainscow and Brand 1999b). Le même type d'analyse a été appliqué par notre groupe sur coeur isolé perfusé, permettant de démontrer *in situ* l'activation parallèle des processus de production et de consommation d'énergie par le calcium (Diolez et al. 2007).

Pour expliquer le changement d'état stationnaire d'un système provoqué par un effecteur externe, Ainscow and Brand (1999a) décrivent la réponse du système à l'effecteur comme la combinaison de plusieurs effets distincts. Ainsi, si l'état stationnaire d'un système est modifié cela signifie qu'au moins un des modules de ce système est sensible à l'effecteur. Cette perturbation de l'activité du ou des modules *cibles* sous l'action de l'effecteur externe (**effet direct** de l'effecteur) est à l'origine d'une variation de l'intermédiaire (dans notre système simple) qui va secondairement entraîner une réponse des autres modules du système (**effet indirect** de l'effecteur) via leur élasticité par rapport à l'intermédiaire. L'**effet global** de l'effecteur sur le flux du système au travers des modules dépend alors du coefficient de contrôle des modules sur le flux, puisqu'il traduit l'effet de la modification d'activité du module (induite par l'effet direct de l'effecteur) sur le flux. La description de ces différents effets permet d'accéder à l'ensemble de la régulation intégrée du système induite par l'action de l'effecteur.

2.3 APPLICATION À L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE

Depuis plusieurs années, notre équipe, contribue au développement de l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA, (Diolez et al. 2007)). Le coeur isolé perfusé est apparu comme un système très prometteur pour ce type d'étude et a permis de réaliser la première application de l'approche sur un organe entier (Diolez et al. 2002). En effet, lorsqu'on s'intéresse à un système intégré, il devient difficile de considérer de manière indépendante les très nombreuses réactions enzymatiques qui y sont interconnectées : l'échelon moléculaire étant trop complexe sur un tel modèle, il est plus

judicieux d'étudier le flux résultant de toute la voie métabolique, sachant que chacune des enzymes impliquées dans cette voie joue un rôle dans l'obtention du flux global.

2.3.1 Description de l'Énergétique Cardiaque en Modules

L'étude des systèmes biologiques complexes passe par la simplification de ses systèmes, en intégrant les grands groupes de fonctions/réactions dans des modules bien distincts (Brand and Curtis 2002). Comme on vient de le voir, l'application des concepts de l'Analyse du Contrôle permet alors ensuite d'accéder aux propriétés intégrées des différents composants (modules) du système (Brand and Curtis 2002).

La bioénergétique cardiaque peut être considérée comme une voie de transfert d'énergie générée à partir de l'oxydation des différents substrats par les enzymes glycolytiques et mitochondriales, et utilisée pour l'activité mécanique (contraction) cardiaque. Il est possible de réduire la complexité de ce système à deux modules (figure 11) (Ingwall and Weiss 2004, Weiss et al. 2006, Diolez et al. 2007) :

- un module de production d'énergie, ou *module Producteur*, comprenant l'ensemble des processus permettant la génération d'énergie, c'est à dire non seulement le fonctionnement mitochondrial et glycolytique, mais également l'apport d'O₂ et de substrats (voir sous-section 1.3.1.1)
- un module utilisant cette énergie, ou *module Consommateur*, défini comme l'ensemble des processus consommateurs d'ATP. Dans le cœur en contraction, ce sont majoritairement les ATPases de la myosine des myofibrilles cardiaques et les pompes ioniques impliquées dans les mouvements calciques (voir sous-section 1.3.1.1).

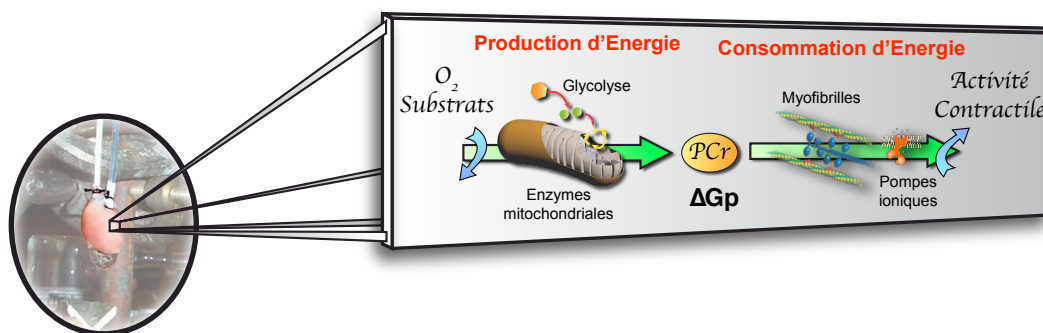


FIG. 11 – *Définition de l'Énergétique Cardiaque en Différents Modules.* Le système bioénergétique cardiaque est défini en deux modules, Producteur et Consommateur du ΔG_p , dont les variations sont directement représentées par les variations de PCr.

Du fait de la présence du système des CK cytosoliques (voir sous-section 1.3.1.1) ces deux modules sont directement connectés par le ΔG_p , dont les variations se répercutent sur le niveau de PCr. L'utilisation des techniques non traumatiques de la spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du phosphore ³¹P permet

le suivi des modifications de PCr, qui peut alors être considéré comme l'intermédiaire mesurable entre les deux modules, Producteur et Consommateur du ΔG_p . Enfin, ce système énergétique ayant pour finalité la contraction cardiaque, le niveau de travail myocardique reflète directement le flux énergétique qui traverse le système. Ceci est renforcé par la relation linéaire qui existe entre la consommation d'oxygène myocardique (MVO_2) et le niveau de contraction cardiaque (figure 12) qui confirme l'égalité des flux de production et de consommation.

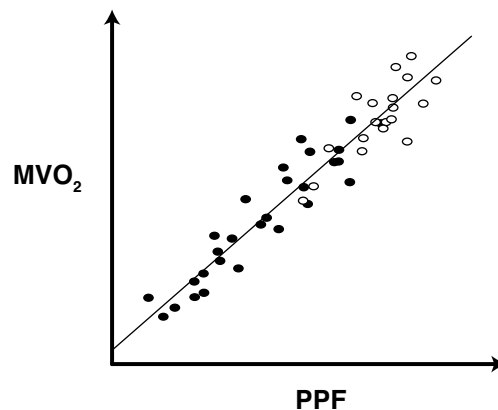


FIG. 12 – *Relation linéaire entre consommation d'oxygène et activité contractile dans le coeur. MVO_2 , consommation myocardique d'oxygène ; PPF, Produit Pression par Fréquence (représentatif de l'activité contractile)*

2.3.2 Légitimité et Limites du Modèle

2.3.2.1 La phosphocréatine, intermédiaire représentatif du ΔG_p

L'application de MoCA sur le système énergétique cardiaque se base notamment sur le fait que la phosphocréatine peut être considérée comme intermédiaire entre production et consommation d'énergie, dans le sens où les variations de sa concentration sont représentatives des variations du ΔG_p . Cette supposition raisonnable repose sur la théorie de l'équilibre de la réaction de la créatine kinase. Ce postulat est de plus en plus admis de nos jours, et est couramment utilisé dans les études les plus récentes (Meyer et al. 1984, McFarland et al. 1994, Jeneson et al. 1996; 2000, Kushmerick and Conley 2002, Beard 2006, Korzeniewski 2007, Wu et al. 2008), notamment pour estimer la concentration en ADP (non détectable directement par RMN de par sa concentration trop faible), la valeur du ΔG_p et pour étudier les mécanismes de régulation des flux d'énergie dans les cardiomyocytes en état physiologique normal et pathologique (Jeneson et al. 2000, Wu et al. 2008). L'application de techniques RMN particulières (techniques de transfert de saturation) sur muscle a permis la quantification des flux de la réaction de la créatine kinase ($PCr^- + MgADP^- + H^+ \xrightleftharpoons[V_r]{V_f} Cr + MgATP^-$) dans le sens d'hydrolyse et de synthèse d'ATP (McFarland et al. 1994). Le résultat essentiel est que sur une gamme d'hydrolyse d'ATP allant jusqu'à un facteur 10, les auteurs

ont mesuré des flux similaires dans les deux directions, autrement dit que la réaction était à l'équilibre. De plus, la vitesse de réaction de la CK était toujours plus importante que le flux d'hydrolyse d'ATP, et donc assez importante pour que la réaction "tamponne" le ΔG_p (McFarland et al. 1994). De ce fait, toute variation de la [PCr] peut être considérée comme représentative d'une modification du ΔG_p . Ceci a été confirmé dans les travaux de notre équipe, dans lesquels la détermination des élasticités de chacun des modules à partir du ΔG_p ou de la [PCr] ont donné des résultats similaires (Cécile Simon, DEA).

Cependant, les travaux de modélisation de l'énergétique cardiaque de Saks and Aliev (1996) et Vendelin et al. (2000) ont suggéré que la concentration d'ADP durant la contraction cardiaque pouvait augmenter de manière beaucoup plus importante que ce qui est prédit en se basant sur une réaction de la CK à l'équilibre. Cependant, ces modèles sont développés en admettant deux postulats qui tendent à amplifier le phénomène :

- l'activité de la CK dans les cardiomyocytes a été définie comme relativement faible ($6 \text{ mmol} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot (\text{kg tissue})^{-1}$) comparé aux valeurs de l'ordre de $25 - 40 \text{ mmol} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot (\text{kg tissue})^{-1}$ mesurées pour l'isoforme cytosolique in vivo (Nascimben et al. 1996, Spindler et al. 1999), et les auteurs ont émis l'hypothèse d'une diffusion limitée des nucléotides dans le compartiment cytosolique.
- les auteurs considèrent la membrane externe mitochondriale comme une barrière de diffusion sélective pour les métabolites adényliques. Ainsi, un facteur censé refléter la moindre perméabilité de la membrane mitochondriale à l'ADP (nommé le facteur "x" (Appaix et al. 2003), facteur dont l'existence n'a pas encore pu être démontrée) a été introduit dans les équations du modèle.

Ainsi, l'hypothèse d'une réaction de la CK loin de l'équilibre semble être une propriété spécifique du modèle de ces auteurs et demande à être démontrée expérimentalement. De ce fait, même si ces propriétés ne sont pas nécessairement invalides pour les myocytes, ces hypothèses particulières ne se basent pas sur des justifications expérimentales et requièrent d'autres investigations.

Ainsi, dans notre modèle, la définition de la PCr comme intermédiaire énergétique entre production et consommation d'énergie apparaît raisonnablement justifié. De plus, la détermination des élasticités dans notre approche reposant sur la mesure de variations relatives d'intermédiaire et de flux, la détermination expérimentale d'une valeur erronée de PCr ne remettrait pas en cause l'application de l'analyse.

2.3.2.2 L'Énergétique Cardiaque, un Système en État Stationnaire Dynamique

L'Analyse Modulaire du Contrôle permet l'étude des systèmes dans des états stationnaires, caractérisés par des niveaux de flux et d'intermédiaire constants. Or le coeur est un organe en perpétuel fonctionnement. Ainsi, pour assurer la distribution sanguine dans tout l'organisme, le muscle cardiaque se contracte de façon cyclique

selon une succession de cycles cardiaques durant lesquels les cardiomyocytes sont tour à tour en état de contraction et de relaxation.

La relation directe entre les changements de pression développée et le niveau d'intermédiaires énergétiques phosphorylés a bien été définie (Neubauer 1998). En effet, en utilisant les propriétés non-invasives de la RMN, de nombreuses études ont montré, sur coeur isolé perfusé, des variations synchrones des concentrations d'intermédiaires énergétiques (principalement PCr, ATP et Pi) et de la pression développée au cours du cycle cardiaque (figure 13), quelque soit le substrat utilisé (Fossel et al. 1980, Kusuoka et al. 1985, Tanaka et al. 1992, Illing et al. 1998, Neubauer 1998, Spindler et al. 2001). Ces oscillations des intermédiaires énergétiques au cours du cycle cardiaque ont également été mises en évidence par Wikman-Coffelt et al. (1983) au moyen de mesures biochimiques, en utilisant un système de freeze-clamp asservi à un stimulateur, appareillage permettant de congeler les coeurs en seulement 5 ms.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980)

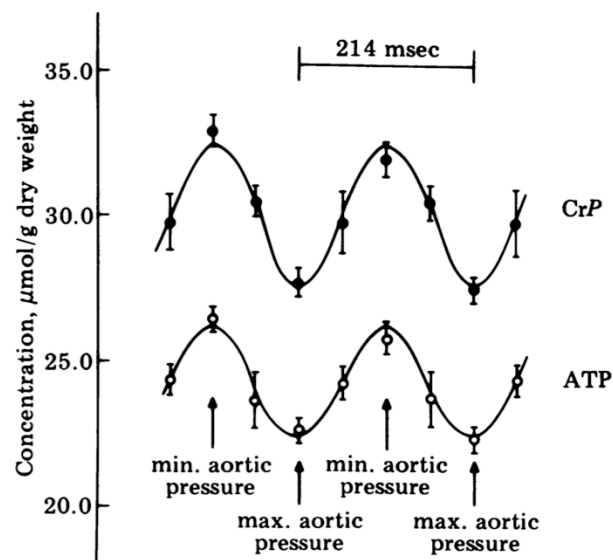


FIG. 13 – Évolution des concentrations des métabolites phosphorylés pendant le cycle cardiaque. Données acquises par RMN sur des coeurs isolés perfusés de rat (système coeur travaillant) avec 11 mM de glucose comme substrat. (figure issue de (Fossel et al. 1980))

Cependant, l'observation de ces oscillations *in vivo* n'est pas unanime. Ainsi, seuls Toyooka et al. (1986) ont observé des modifications synchronisées du contenu en PCr et en ATP sur rat vivant, avec un contenu minimal au 2/3 de la systole et un contenu maximal dans le dernier 1/3 de la systole (avec la contenu en Pi oscillant de manière antiphasique). Par contre, sur des coeurs plus gros, aucune oscillation des métabolites n'a pu être observée, que ce soit sur chien, avec les expériences de Balaban and Heineman (1989) avec un temps de résolution de 50 ms, ou sur des volontaires humains sur lesquels Grist et al. (1989) n'ont pas observé de différence entre des

spectres acquis en fin de systole (150 *ms* après l'onde R sur l'électrocardiogramme) et à la moitié de la diastole (400 *ms* après l'onde R).

Les oscillations de concentration en intermédiaires énergétiques durant le cycle cardiaque ne remettent pas en cause l'application de l'Analyse Modulaire du Contrôle sur le système énergétique cardiaque. En effet, même si ces oscillations existent, les modifications de métabolites sont synchronisées avec les oscillations de la pression développée. Or, le flux du système (PPF) est en fait la moyenne de ces modifications de pression développée (prise en compte de la différence de pression développée). Ainsi, à tout niveau moyen de contraction - et donc à tout niveau de PPF - correspond un niveau moyen d'intermédiaires énergétiques. L'acquisition de spectres RMN ³¹P donne accès à ce niveau moyen d'intermédiaire correspondant à l'état stationnaire de PPF.

De plus, l'ensemble des calculs utilisés pour déterminer les élasticités (et donc les coefficients de contrôles) sollicitent des variations relatives de [PCr] et de PPF. Ainsi, même si ces paramètres oscillent, le calcul des variations relatives lors des changements d'états stationnaires limite fortement (voire annule) l'importance que pourraient avoir ces oscillations dans notre modèle.

Ainsi, on peut considérer que l'application de l'Analyse Modulaire du Contrôle pour l'étude du système énergétique cardiaque correspond (de manière relativement satisfaisante) à l'étude d'états stationnaires (*moyens*), que ce soit en ce qui concerne le flux (PPF) ou l'intermédiaire (PCr).

CONCLUSION DU CHAPITRE

Appliquée au modèle du cœur hypoxique, l'analyse MoCA devrait permettre de mieux comprendre les adaptations cardiaques associées à l'hypoxie chronique en appréhendant le système de manière globale et ainsi de quantifier les répercussions fonctionnelles de l'ensemble des processus adaptatifs sur le contrôle et la régulation des flux énergétiques.

OBJECTIFS DE CETTE THÈSE

3

Le but de cette thèse était de mettre en place l'analyse MoCA sur le modèle de coeur isolé perfusé de souris, et de montrer l'intérêt de l'utilisation de cette approche intégrative dans la compréhension des modifications développées durant une pathologie cardiaque complexe. L'originalité de ce travail a résidé dans l'utilisation d'un système expérimental intégré, le coeur isolé perfusé, lui même analysé par une approche globale.

Il est en effet de plus en plus admis que la compréhension des phénomènes biologiques nécessite la considération des mécanismes à un haut niveau d'intégration ([Brand and Curtis 2002](#), [Noble 2003](#), [Strange 2005](#), [Weiss et al. 2006](#)). Notre équipe participe activement à cette démarche par le développement d'une approche intégrative, l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA, ([Diolez et al. 2002](#); [2007](#))), qui a déjà permis une meilleure compréhension de l'activation de l'énergétique cardiaque par le calcium ([Diolez et al. 2007](#)).

Durant cette thèse, cette même approche a été utilisée pour mieux appréhender les répercussions globales de l'acclimatation à l'hypoxie chronique sur le coeur, un modèle de pathologie. Les effets de l'hypoxie chronique sur la fonction cardiaque sont en effets connus pour être très complexes, et impliquent une atteinte globale du myocarde, que ce soit au niveau anatomique, fonctionnel, métabolique ou énergétique ([Ostadal and Kolar 2007](#), [Essop 2007](#)). Ce modèle apparaît donc comme un outil de choix pour montrer la pertinence de l'analyse MoCA dans la compréhension des modifications globales de l'énergétique cardiaque, comme celles développées dans les pathologies.

Deuxième partie

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MODÈLE ANIMAL

1

SOMMAIRE

1.1 POPULATIONS D'ÉTUDE	51
1.2 GÉNÉRATION DU MODÈLE DE SOURIS HYPOBARES	52
1.2.1 Caisson Hypobare	52
1.2.2 Diagnostic de l'Hypertrophie Ventriculaire Droite	53

L'UTILISATION de modèles animaux est un outil important de la recherche actuelle qui permet de mieux appréhender et comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques impliqués dans de nombreuses pathologies.

Ce chapitre présente le modèle murin hypoxique qui a permis l'étude des adaptations de l'énergie cardiaque à l'hypoxie chronique dans cette thèse.

1.1 POPULATIONS D'ÉTUDE

L'ensemble des expériences a été effectué sur des souris femelles de type SWISS (Élevage Janvier, Le Genest-S^t-Isle, France). Deux groupes de ces souris ont été comparés pour étudier les modifications de l'énergétique cardiaque induites par l'hypoxie chronique :

- un groupe de souris **contrôles** (9 semaines)
- un groupe de souris **hypoxiques** : souris (6 semaines) soumises à une hypoxie chronique de 3 semaines (voir section 1.2.1)

Le conditionnement du groupe hypoxique à partir de l'âge de 6 semaines permet d'éviter tout biais expérimental dû à une différence d'âge entre les groupes au moment des expériences.

Si l'on se réfère à la courbe de poids des souris SWISS (figure 14), 9 semaines correspondent à un état de stabilité relative en terme de développement corporel, avec une évolution faible à partir de 6 semaines. Cette particularité permet de limiter la variabilité liée aux modifications physiologiques relatives à la croissance.

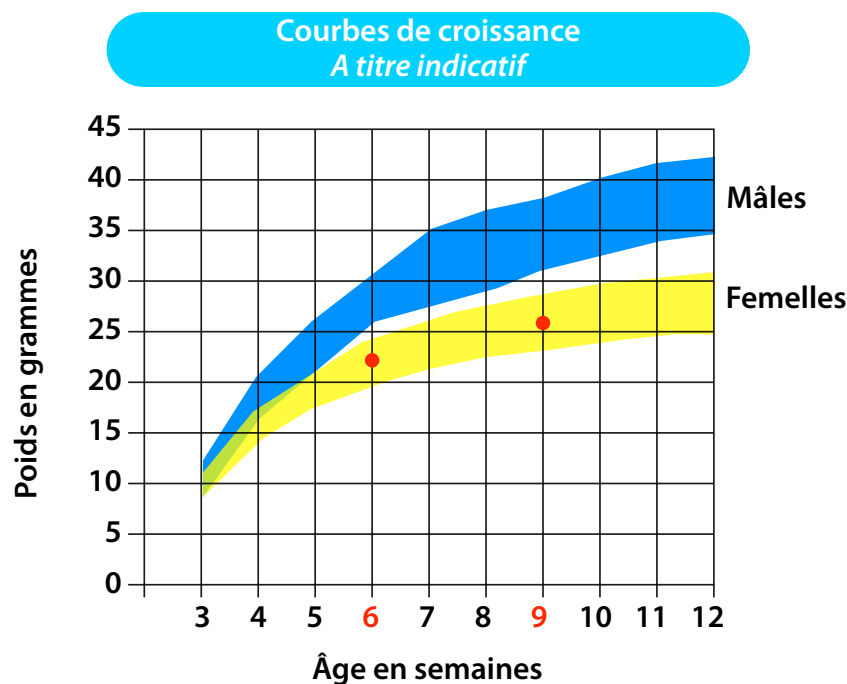


FIG. 14 – *Courbe de poids des souris SWISS (d'après le catalogue de l'élevage JANVIER, Le-Genest-S^t-Isle, France). Au moment des expériences, les souris femelles étaient âgées de 9 semaines, ce qui correspond à un état de stabilité en terme de développement corporel.*

Ces animaux ont été élevés dans des conditions constantes de température et d'humidité, en suivant des cycles jour/nuit de 12h/12h. Toutes les souris ont été nourries à volonté. En conséquence, notre étude ne différencie pas l'acclimatation propre à l'hypoxie chronique de celle propre à l'anorexie induite par l'exposition à

un environnement hypoxique (Daneshrad et al. 2001; 2000, Barrie and Harris 1976), mais s'attache aux effets globaux de l'hypoxie chronique.

1.2 GÉNÉRATION DU MODÈLE DE SOURIS HYPOBARES

L'accès au modèle de souris hypobares été rendu possible grâce à une collaboration avec l'équipe du Professeur Bernard Muller (Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, INSERM U885, E356), qui dispose d'une chambre hypobare (figure 15).

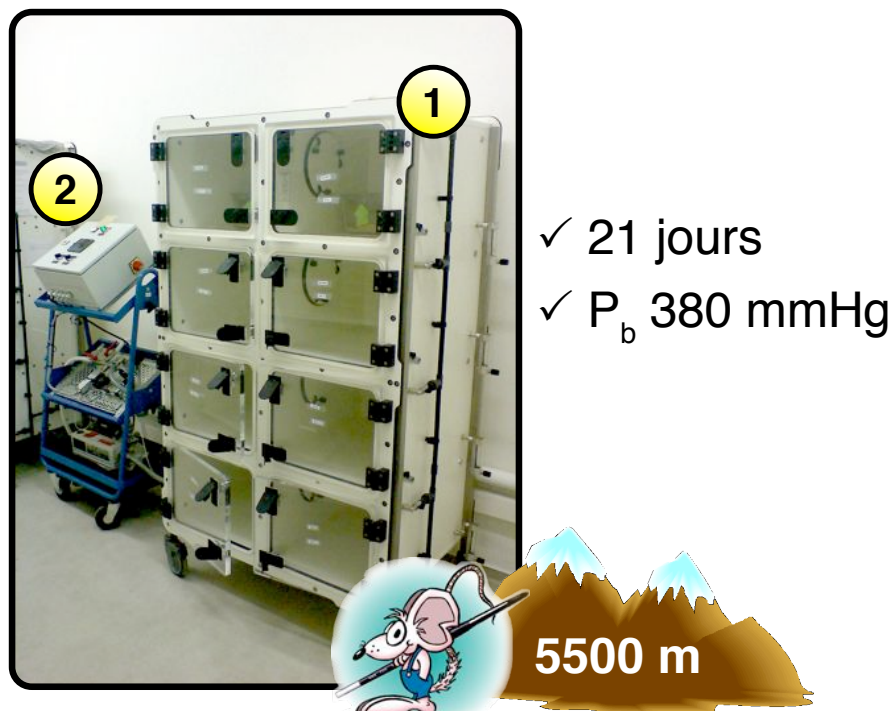


FIG. 15 – *Caisson Hypobare*. Chambre hypobare (1) dont le maintien d'une pression barométrique de 380 mmHg est assuré par un système de régulation automatique (2)

1.2.1 Caisson Hypobare

Pour le groupe hypobare, les souris ont été hébergées pendant 21 jours dans un caisson (Minerve, Esternay, France) dont la pression barométrique a été abaissée à 380 mmHg (équivalent à $\frac{1}{2}$ atmosphère et à une altitude de 5500 m). La pression inspirée en oxygène correspondante est donc diminuée de moitié par rapport au groupe contrôle, soit une valeur de 70 mmHg.

Le caisson est divisé en plusieurs compartiments, chacun étant équipé d'un capteur de pression propre et d'une entrée d'air unique avec un débit de renouvellement d'air de 6 L/min. Ainsi, la pression de 380 mmHg est continuellement contrôlée et

maintenue constante pour chacun des compartiments (figure 15). Le caisson est ouvert 3 fois par semaine pour le nettoyage des cages et le réapprovisionnement en eau et nourriture. Ces ouvertures permettent également de sortir les animaux pour les expériences, une fois la période d'exposition à l'hypoxie terminée. L'ouverture du caisson est gérée par un système de régulation automatique (Duffau, Talence, France, figure 15) qui assure une remontée en pression (ainsi que sa dépressurisation à la fin du nettoyage des compartiments) progressive, sur une durée de 45 *min*.

1.2.2 Diagnostic de l'Hypertrophie Ventriculaire Droite

Deux méthodes ont été utilisées afin d'apprécier l'hypertrophie ventriculaire droite secondaire à l'hypoxie chronique :

- **Indice de Fulton** : Herrmann and Wilson (1922) puis plus tard Fulton et al. (1952) ont décrit une méthode consistant à disséquer séparément le ventricule droit et le ventricule gauche et à les peser l'un l'autre. L'hypertrophie du ventricule droit est alors appréciée par l'augmentation significative de l'*indice de Fulton*, défini par la relation suivante :

$$\text{Indice de Fulton} = \frac{\text{Masse Ventricule Droit}}{\text{Masse (Ventricule Gauche + Septum)}}$$

- **Imagerie par Résonance Magnétique** : les modifications des masses ventriculaires ont également été appréciées par la mesure des volumes myocardiques *in vivo* à l'aide d'une séquence spécifique d'Imagerie par Résonance Magnétique (Miraux et al. 2009) (collaboration interne au laboratoire - Eric Thiaudière et Sylvain Miraux) (figure 16).

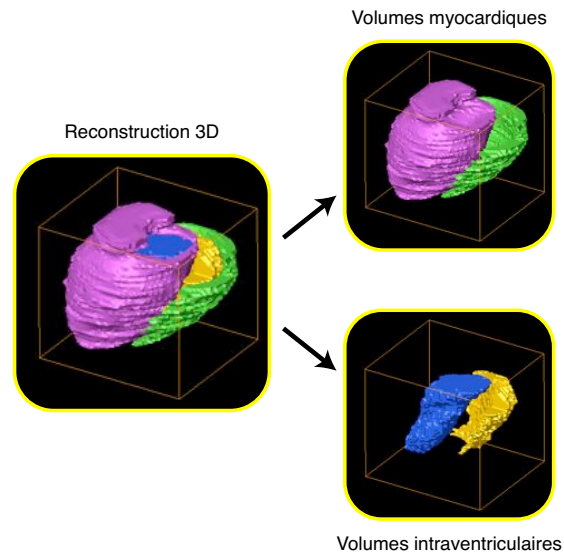


FIG. 16 – *Mesure des modifications anatomiques cardiaques. Le traitement des images 3 dimensions a permis la détermination des volumes des masses myocardiques ainsi que des volumes intraventriculaires in vivo sur la souris.*

COEUR DE SOURIS ISOLÉ-PERFUSÉ

2

SOMMAIRE

2.1 CONSTRUCTION DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL	57
2.2 PERFUSION DU COEUR DE SOURIS	58
2.3 PROTOCOLES DE PERFUSION	60
2.3.1 Hypoxie Aigue	60
2.3.2 Injection de Drogues	60

La perfusion des coeurs de mammifères fut mise au point sous l'influence de Henry Newell Martin (1848 - 1893) et surtout Oscar Langendorff (1853 - 1908) qui décrit en détail la technique et donna son nom à cette préparation expérimentale ([Langendorff 1895](#)).

Le modèle du coeur isolé perfusé s'est aujourd'hui imposé comme un outil de choix pour étudier la fonction cardiaque et mieux comprendre les mécanismes qui la régissent. Ce chapitre présente le développement de notre système spécifique de coeur isolé perfusé de souris utilisé dans cette thèse.

2.1 CONSTRUCTION DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL

Le modèle du coeur isolé perfusé est une technique qui fait partie du savoir faire du laboratoire depuis de nombreuses années. En particulier, un montage expérimental dédié aux coeurs de rat/cobaye, couplé aux techniques de spectroscopie RMN, a déjà permis des études approfondies de l'énergétique cardiaque (Dos Santos et al. 2000, Diolez et al. 2002; 2007, Korzeniewski et al. 2008; 2009a).

L'utilisation de ce même montage pour les études sur souris est rendue plus difficile en raison des particularités du coeur murin comparé au coeur de rat/cobaye :

- coeur beaucoup plus sensible aux variations de température (nécessité d'un système de thermorégulation spécifique)
- taille de coeur très petite (8 mm en grand axe) augmentant les difficultés des acquisitions RMN (facteur de remplissage d'antenne réduit)

Pour répondre à ces contraintes expérimentales, un nouveau système de perfusion spécifique à la perfusion des coeurs de souris a été développé (voir figure 17).

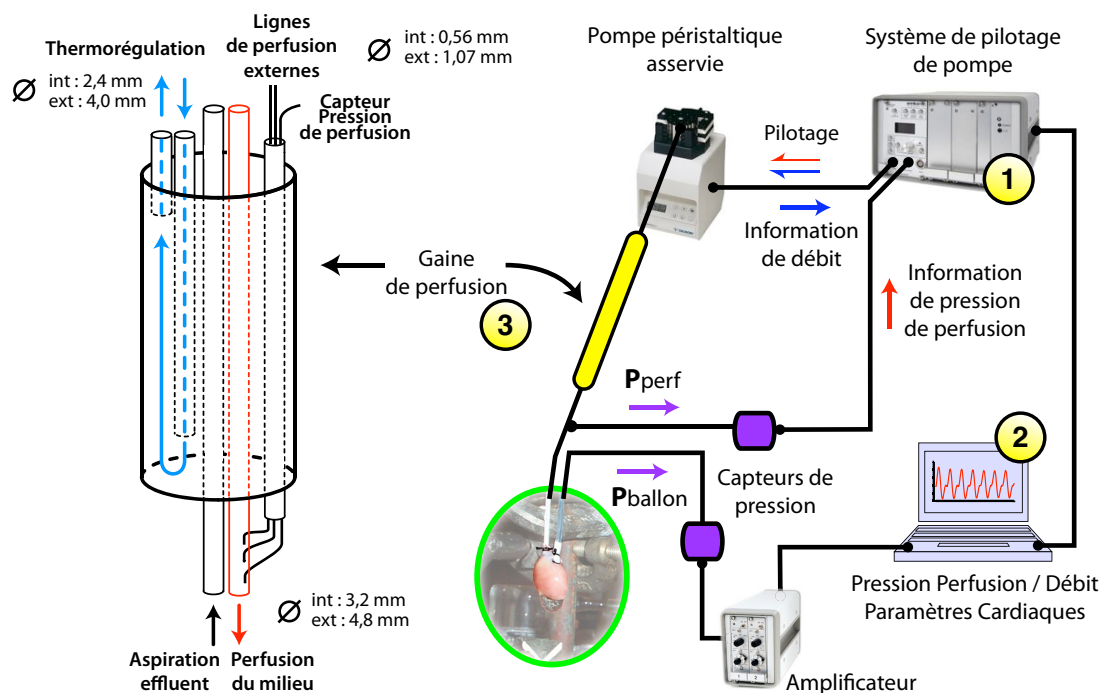


FIG. 17 – *Schéma du montage expérimental.* Un système d'asservissement de pompe (1) permet de perfuser le coeur à pression (flèches rouges) ou à débit constant (flèches bleues). Ces informations de perfusion, ainsi que l'ensemble des paramètres cardiaques issus du ballonnet inséré dans le ventricule gauche du coeur (voir section 2.2) sont continuellement enregistrées par un ordinateur dédié (2). Une gaine de perfusion souple (3) permet l'étude du coeur dans un aimant RMN (voir chapitre 3). Cette gaine assure la thermostatisation du milieu de perfusion, et est dotée de lignes de perfusion externes pour l'injection de drogues (voir sous-section 2.3.2).

Contrairement à un système classique de perfusion Langendorff (pression constante de perfusion assurée par une colonne), ce montage est basé sur un sys-

tème d'asservissement de pompe (EMKA Technologies®). Cet appareillage traite le signal issu d'un capteur de pression branché en dérivation sur la canule de perfusion du coeur (figure 17) et régule le débit de la pompe en fonction de la pression de perfusion effective mesurée. Cette caractéristique offre l'opportunité de perfuser le coeur suivant une pression ou un débit de consigne défini par l'opérateur.

La principale difficulté a été la construction d'une gaine de perfusion thermostatée adaptée aux dimensions de l'aimant DPX500 du laboratoire (diamètre du trou d'insertion 2,6 cm). Toutefois, comme nous le verrons par la suite, l'accès à cet aimant a permis une augmentation très significative du signal RMN des coeurs de souris (voir section 3.2). En plus des caractéristiques de la gaine présentées en figure 17, une photo du système complet est présentée dans la figure 18.

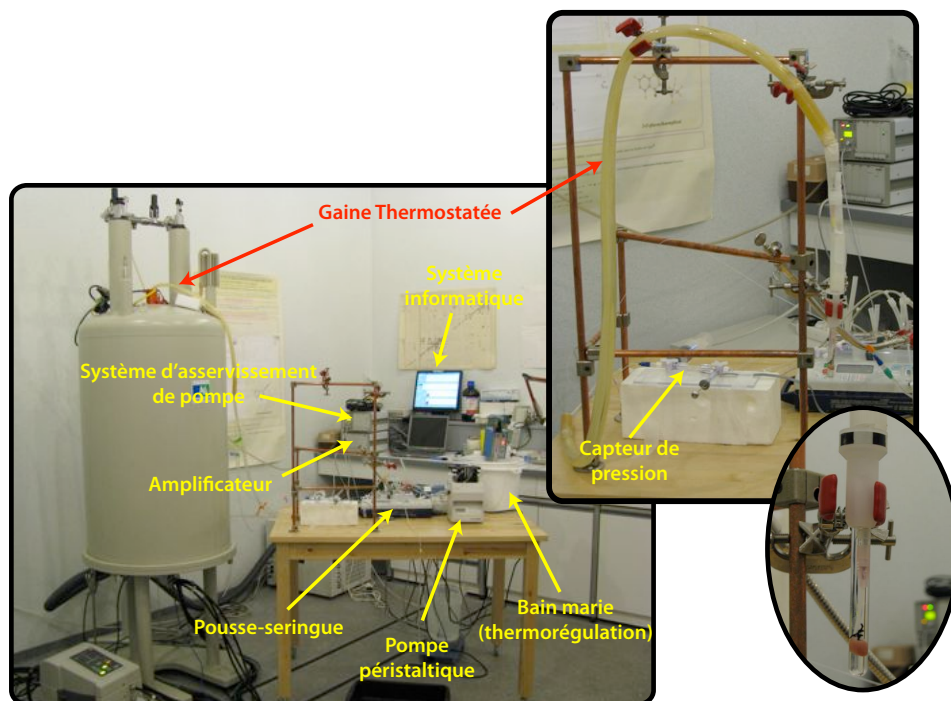


FIG. 18 – *Montage de perfusion de coeur de souris. La construction d'un système de perfusion complet pour les coeurs de souris a permis d'accéder à l'aimant 11,7T du laboratoire*

2.2 PERFUSION DU COEUR DE SOURIS

Les coeurs sont prélevés après euthanasie des souris par dislocation cervicale. Une incision péritonéale et diaphragmatique permet d'exciser le coeur battant. Le coeur est alors plongé dans une solution isotonique héparinée (Krebs-Henseleit modifié) à une température de 2°C afin de stopper les contractions cardiaques. Cette solution, identique au milieu de perfusion, est composée de (en mM) NaCl 108; KCl 5,9; MgSO₄ 1,2; EDTA 0,5; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,5; Na-Pyruvate 5; Glucose 10 et Mannitol 1,1; pH 7,4. L'ajout d'héparine dans ce milieu (100 U.I. dans 40 mL) permet de limiter

la formation de caillots sanguins. Le montage du coeur sur une canule de perfusion est ensuite réalisé sous loupe binoculaire : la cavité ventriculaire gauche est dégagée par excision de l'oreillette et l'artère pulmonaire est incisée. Ces deux étapes permettront respectivement l'introduction d'un ballonnet en latex dans le ventricule (pour la mesure des paramètres cardiaques, voir ci-dessous) et l'amélioration du drainage coronaire une fois le coeur perfusé. Le ventricule gauche est aussi percé au niveau de l'apex à l'aide d'une aiguille afin d'améliorer le drainage veineux thébésien.

La canule de perfusion sur laquelle est ligaturé le coeur est ensuite branchée sur le système de perfusion qui délivre le milieu de perfusion thermo-régulé à 37°C à pression constante de 90 mmHg. Ces conditions de perfusion correspondent aux conditions recommandées pour le modèle du coeur isolé perfusé de souris (Sutherland et al. 2003). Le myocarde est nourri par les artères coronaires irriguées à partir de la perfusion rétrograde de l'aorte par le milieu décrit ci-dessus. La perfusion en double substrats (Glucose-Pyruvate) s'est révélée nécessaire chez la souris pour assurer la stabilisation des paramètres mécaniques (pression développée et fréquence cardiaque). L'oxygénation du perfusât est assurée en bullant le milieu avec un mélange gazeux 95% O₂ - 5% CO₂.

Un ballonnet en latex connecté, via un cathéter rempli d'eau, à un capteur de pression (DPT-400, Deltran®) est introduit dans le ventricule gauche du coeur battant. Le volume du ballonnet est contrôlé à l'aide d'une voie latérale composée d'un cathéter relié à une seringue d'injection d'eau. En conditions de référence, la pression intraventriculaire en fin de diastole est ajustée à 6 mmHg (figure 19).

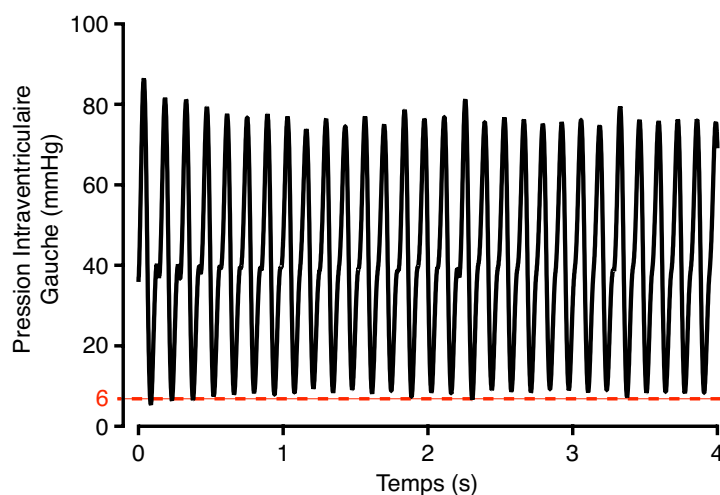


FIG. 19 – *Tracé expérimental typique de la pression ventriculaire gauche développée. L'enregistrement continu de la pression exercée par le myocarde sur le ballonnet inséré dans le ventricule gauche permet d'obtenir la pression développée ainsi que la fréquence cardiaque du coeur.*

Les coeurs ne sont pas stimulés et se contractent spontanément. La performance mécanique est appréciée par la PPF (Produit Pression × Fréquence) qui est directement proportionnelle au travail cardiaque (Sutherland et al. 2003). Elle est caractérisée

par le produit de la différence de pression (DPVG, en *mmHg*, soustraction de la valeur de pression diastolique à celle de la pression systolique) et de la fréquence cardiaque (FC, en battement par minute, *bpm*). Un exemple de tracé typique à partir duquel sont calculés les paramètres cardiaques est présenté en figure 19.

Le coeur perfusé est ensuite placé dans un tube de silicium de 10 *mm* de diamètre correspondant à une sonde RMN dual permettant l'enregistrement de signaux ^1H et ^{31}P (voir section 3.2). Il baigne dans la solution de perfusion à 37°C. Un circuit d'aspiration en continu permet de drainer l'effluent coronaire et de maintenir constant le volume du liquide dans le tube RMN.

2.3 PROTOCOLES DE PERFUSION

2.3.1 Hypoxie Aigue

Dans nos expériences standards, l'oxygénation du milieu de perfusion avec le mélange gazeux 95% O_2 - 5% CO_2 (voir section 2.2 ci-dessus) assure une pression partielle en oxygène d'environ 600 *mmHg* dans le perfusât (Poizat et al. 1994), conditions de référence pour le modèle du coeur isolé perfusé (Poizat et al. 1994, Kammermeier 1994, Mik et al. 2009).

Dans ce travail, plusieurs groupes expérimentaux ont aussi été étudiés en condition d'hypoxie aigue (Calmettes et al. 2010). Pour ces expériences, la pression partielle en oxygène du milieu de perfusion était abaissée à 100 - 120 *mmHg* par équilibration du milieu de perfusion avec l'air ambiant (Poizat et al. 1994) (pas d'oxygénation supplémentaire par bullage). Dans ce cas, l'ajout de MOPS (10*mM*) dans le perfusât s'est révélé nécessaire pour tamponner le milieu et équilibrer le pH à 7,4.

2.3.2 Injection de Drogues

Deux voies latérales équipées chacune d'une ligne de perfusion, d'une seringue et d'un pousse-seringue automatique, permettent l'injection de drogues directement au niveau du coeur (figure 17 et 18). Les concentrations des drogues dans la seringue de perfusion sont calculées pour correspondre à des vitesses d'injection de l'ordre de 1/60^{ème} à 1/120^{ème} du débit coronaire cardiaque ce qui permet notamment d'éviter tout phénomène d'augmentation de pression de perfusion lors de l'injection des drogues.

Le tableau 1 ci-dessous présente les concentrations finales de l'ensemble des drogues utilisées dans ce travail afin de perturber l'énergétique des coeurs isolés perfusés.

TAB. 1 – Drogues utilisées pour moduler l'énergétique des coeurs

<i>NaCN</i>	0,3 mM	Inhibition modérée de l'activité mitochondriale (inhibition compétitive du complexe IV)
<i>Iodoacétate</i>	75 μ M	Inhibition totale de l'activité glycolytique au niveau de la glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
<i>Adrenaline</i>	3,3 μ g/L	Stimulation inotropique adrénergique
<i>Calcium</i>	1,6 mM	Stimulation inotropique calcique
<i>Rouge de Ruthenium</i>	2,5 μ g/L	Inhibition totale de l'uniport calcique mitochondrial

SUIVI DE L'ÉTAT ÉNERGÉTIQUE DES COEURS PAR RMN DU PHOSPHORE 31

SOMMAIRE

3.1 NOTION DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)	65
3.2 ACQUISITION D'UN SPECTRE ^{31}P DE COEUR DE SOURIS	67
3.3 TRAITEMENT DES DONNÉES	68

LA méthodologie spectroscopique RMN est particulièrement prisée en biologie pour des fins d'exploration métabolique, que ce soit sur cellules isolées ou sur organes entiers ([Ackerman et al. 1980](#), [Gadian and Radda 1981](#), [Cohen 1987](#)). En effet, sa nature non-invasive et atraumatique présente de nombreux avantages par rapport aux techniques d'analyse conventionnelles, même si sa faible sensibilité limite l'utilisation de la méthode pour l'observation de molécules présentes dans les cellules à des concentrations de l'ordre du *mM*.

La mesure des métabolites dans les cellules actives par des techniques RMN fournit une information quantitative détaillée sur la composition chimique, ce qui nous a permis de suivre l'évolution du métabolisme intermédiaire en temps réel dans le coeur de souris isolé perfusé. Ce chapitre décrit dans un premier temps les principes généraux de la RMN, puis présente l'application de cette technique à notre étude.

3.1 NOTION DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)

La RMN est basée sur une propriété intrinsèque de la matière, le *spin* : le noyau d'un atome peut être considéré, en première approximation, comme une sphère chargée positivement et tournant sur elle-même. La rotation de ces charges induit un petit champ magnétique appelé *moment magnétique nucléaire* (noté \vec{u}). Dans un échantillon macroscopique, un grand nombre de noyaux coexistent. On peut considérer qu'ils sont orientés de manière totalement statistique ($\sum \vec{u} = 0$).

Lorsque l'échantillon est plongé dans un champ magnétique externe intense (\vec{B}_0), les moments magnétiques nucléaires s'orientent dans la direction de ce champ, en précessant à une fréquence propre ν_0 (appelée *fréquence de Larmor*). Par exemple, les noyaux de phosphores (spin $\frac{1}{2}$) pourront adopter deux orientations possibles, l'une sensiblement parallèle à \vec{B}_0 et l'autre sensiblement anti-parallèle. Le nombre de noyaux parallèles est légèrement supérieur à celui des noyaux antiparallèles, la somme vectorielle de tous les moments magnétiques nucléaires est alors non-nulle et dirigée dans la direction du champ \vec{B}_0 . Cette somme est appelée l'*aimantation nucléaire* et notée \vec{M} . C'est la phase de **Polarisation** (A, figure 20).

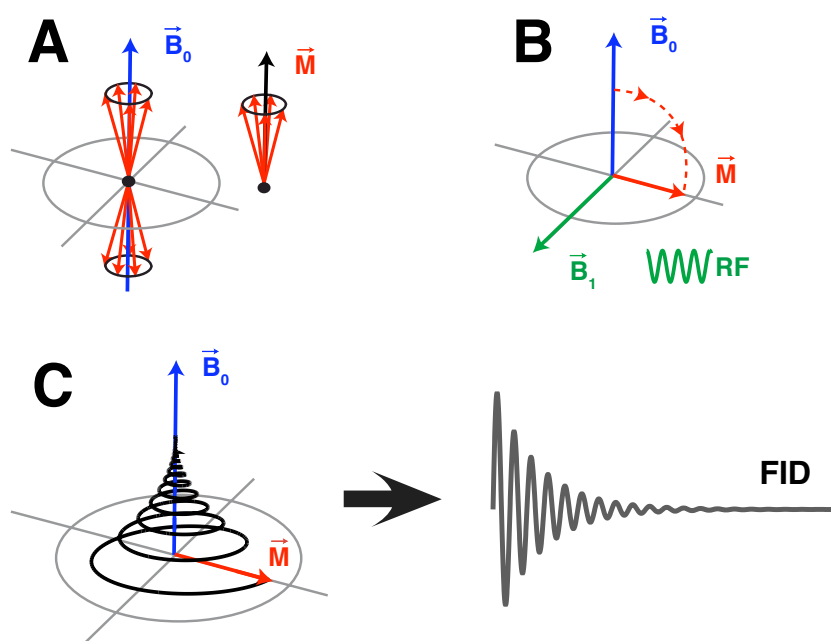


FIG. 20 – *Phénomène de RMN. A) Polarisation* : des spins nucléaires soumis à un champ magnétique \vec{B}_0 s'ordonnent en précessant à une fréquence propre ν_0 autour de la direction de \vec{B}_0 . Il y a création d'une aimantation macroscopique (\vec{M}). *B) Résonance* : en appliquant une onde électromagnétique \vec{B}_1 perpendiculaire à \vec{B}_0 et de fréquence ν_0 on perturbe le système. La conséquence est un changement d'orientation de \vec{M} . *C) Relaxation* : à l'arrêt de l'excitation, les spins retournent à leur état d'équilibre par un phénomène de précession libre. Cette précession génère un signal sinusoïdal amorti, la FID (Free Induction Decay), détecté par l'antenne

L'aimantation \vec{M} , qui constitue le signal détecté par RMN, ne peut être mesuré que dans le plan transversal. Il est alors nécessaire de perturber le système et faire basculer l'aimantation \vec{M} par un phénomène de **Résonance**, en appliquant, sous certaines conditions, une onde électromagnétique \vec{B}_1 (B, figure 20). En général, \vec{B}_1 se situe dans la gamme des radiofréquences (RF), et pour qu'il y ait résonance, cette impulsion doit répondre à deux conditions :

- la direction de \vec{B}_1 doit être perpendiculaire à celle de \vec{B}_0
- la fréquence de \vec{B}_1 doit correspondre à la fréquence de Larmor des spins considérés.

Le signal est mesuré à l'issue de cette excitation RF, pendant la phase de **Relaxation** : retour de l'aimantation \vec{M} à son état d'équilibre (aligné à \vec{B}_0) par un phénomène de *précession libre* qui génère un signal sinusoïdal amorti, dit *Free Induction Decay* ou *FID* (C, figure 20). Ce retour à l'état d'équilibre correspond à la disparition de l'aimantation transversale (A, figure 21) et à la récupération de l'aimantation longitudinale (B, figure 21). Bien que ces deux événements soient simultanés (C, figure 20), ils répondent à deux constantes de temps distinctes : dans les tissus biologiques, l'aimantation ne garde pas un module constant lors de son retour à l'équilibre, de sorte que l'aimantation transversale disparaît plus vite que l'aimantation longitudinale. La relaxation de l'aimantation nécessite donc la définition de deux durées caractéristiques : l'une pour la disparition de l'aimantation transversale (relaxation dite "*spin - spin*", constante T_2), l'autre pour la récupération de l'aimantation longitudinale (relaxation dite "*spin - réseau*", constante T_1) (figure 21).

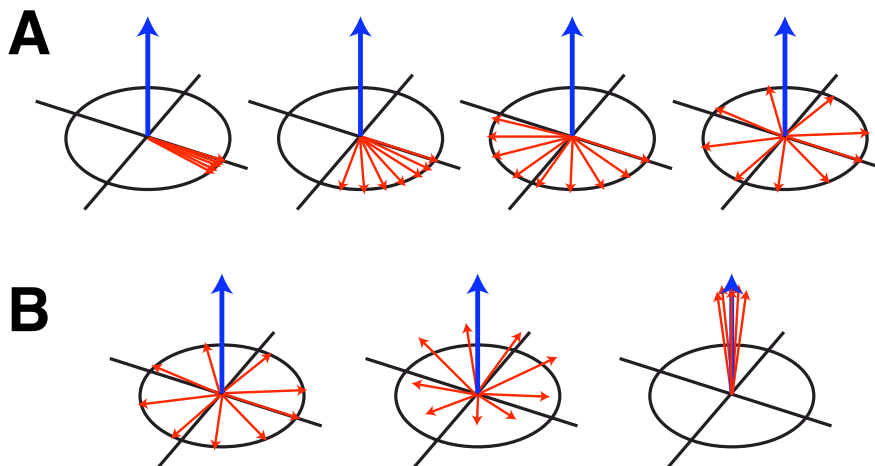


FIG. 21 – **Relaxation RMN.** **A) Relaxation Transversale (T_2)** : Elle correspond à la désynchronisation des spins dans leur mouvement autour du champ \vec{B}_0 due aux interactions entre noyaux voisins. Ces interactions créent des modifications locales du champ magnétique et sont responsables de déphasages qui vont impliquer la décroissance de l'aimantation dans le plan transverse. **B) Relaxation Longitudinale (T_1)** : Elle correspond au retour à l'équilibre thermique du système après l'excitation et décrit la repousse de l'aimantation longitudinale.

Une transformée de Fourier de la FID autorise l'étude du signal dans le domaine fréquentiel, et permet ainsi de distinguer les différentes espèces biochimiques présentes dans l'échantillon en fonction de leur fréquence de résonance propre (influence de l'environnement électronique). On obtient alors un *spectre* caractérisé par plusieurs raies lorentziennes (ou pics), dont les aires sont proportionnelles aux concentrations des espèces biochimiques considérées.

3.2 ACQUISITION D'UN SPECTRE ^{31}P DE COEUR DE SOURIS

Le noyau ^{31}P a été le premier à être utilisé en spectroscopie *in vivo*, en particulier dans l'étude de la physiopathologie du muscle squelettique. Son intérêt réside dans la détection des métabolites énergétiques intermédiaires tels que l'ATP, le phosphate inorganique ou la phosphocréatine (figure 22), métabolites particulièrement pertinents pour la caractérisation de l'énergétique musculaire. Cependant, il est important de noter que, de par sa sensibilité faible par rapport au proton, l'obtention d'un bon rapport signal-sur-bruit en spectroscopie ^{31}P nécessite une accumulation du signal plus importante. Appliquée au modèle du coeur isolé perfusé (voir chapitre 2.2) la spectroscopie RMN du ^{31}P permet l'étude de l'énergétique cardiaque, normale ou pathologique, dans un système qui se rapproche des conditions physiologiques (Babalab 1989, Barr and Lopaschuk 2000, Horn 2006, ten Hove and Neubauer 2008).

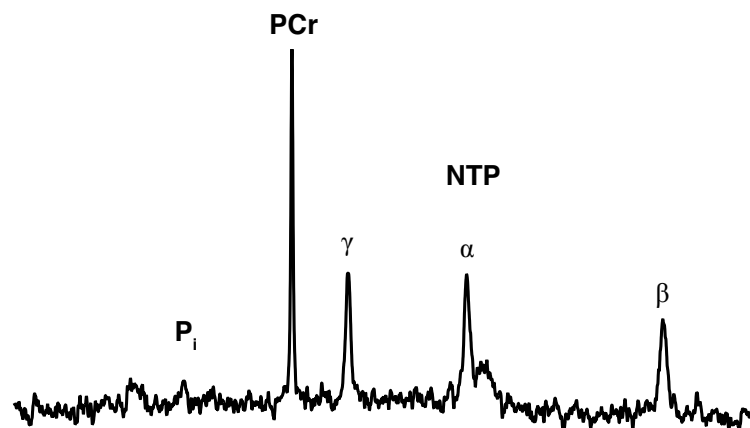


FIG. 22 – *Spectre RMN ^{31}P typique.* En fonction de leur environnement électronique, les molécules de phosphore résonnent à des fréquences légèrement différentes, ce qui permet de distinguer les différentes espèces phosphorylés du métabolisme énergétique cardiaque. **NTP** : nucléotides triphosphates (80 % du signal provient de l'ATP). **PCr** : phosphocréatine. La présence de phosphate inorganique (**P_i**) sur le spectre RMN dépend du substrat utilisé pour la perfusion cardiaque

Dans cette étude, pour étudier l'état énergétique des coeurs isolés perfusés de souris, les premières expériences ont d'abord été effectuées avec un spectromètre Bruker DPX400 équipé d'une sonde broadband de 10 mm accordée sur la fréquence

de résonance du ^{31}P à 161,9 MHz. En effet, l'acquisition de spectre ^{31}P avec cet aimant avait déjà été mise au point au laboratoire pour des études sur coeur isolé perfusé de rat (Dos Santos et al. 2000, Diolez et al. 2007). Toutefois, en raison du volume très réduit des coeurs de souris (150 μL), cette instrumentation ne permettait pas d'obtenir des signaux de qualité satisfaisante pour la résolution temporelle désirée.

Pour remédier à cette limitation expérimentale, le développement d'un système de perfusion cardiaque entièrement dédié au coeur de souris (voir section 2.1), ainsi que l'achat d'une antenne 10 mm spécifique phosphore de dernière génération, nous a permis d'accéder à un aimant de champ magnétique plus important (11,7 T). Ceci a contribué à grandement augmenter le rapport signal-sur-bruit (S/B) de nos spectres ^{31}P tout en diminuant les temps d'acquisition (figure 23).

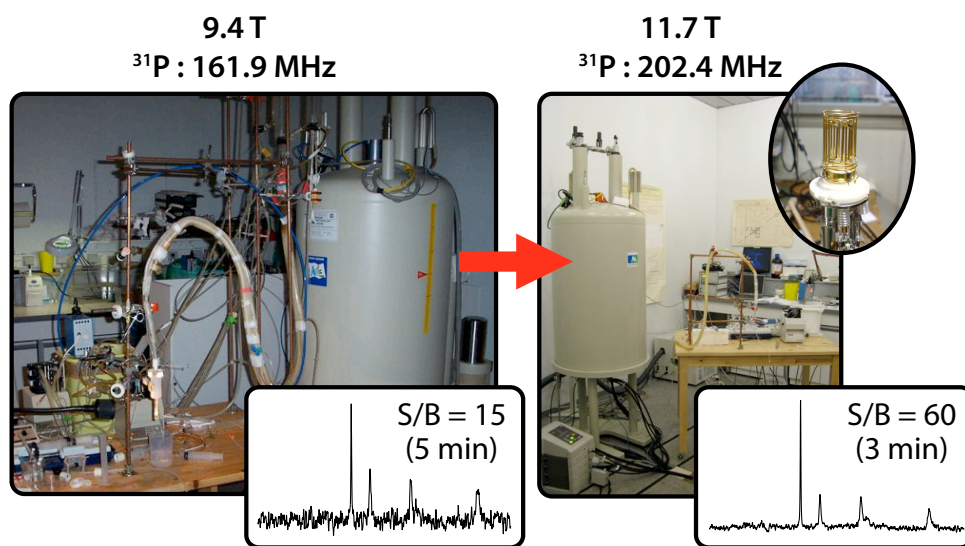


FIG. 23 – Développement d'un système dédié à l'acquisition ^{31}P sur coeur isolé perfusé de souris. La construction d'un système de perfusion adapté à un aimant haut champ 11,7 T (voir section 2.1), ainsi que l'utilisation d'une antenne RMN spécifique phosphore nous a permis d'augmenter considérablement la qualité des spectres ^{31}P de coeur isolé perfusé de souris tout en diminuant les temps d'acquisition

Les spectres sont ainsi obtenus après accumulation et sommation de 90 signaux de précession libre, correspondant à un temps d'acquisition de seulement 3 min par spectre. Les paramètres d'acquisition utilisés pour l'acquisition des spectres ^{31}P des coeurs de souris sont reportés dans le tableau 2.

3.3 TRAITEMENT DES DONNÉES

Après transformation de Fourier du signal RMN, l'aire de chaque pic est obtenue à partir de la décomposition numérique du spectre en somme de Lorentziennes (figure 24). Dans le cas d'une séquence d'impulsion classique autorisant la relaxation

TAB. 2 – Paramètres d'acquisition des spectres ^{31}P de coeurs isolés perfusés sur aimant DPX500

Fréquence de résonance	202,4 MHz
Impulsion RF	13 μs
Angle de bascule correspondant	60°
Temps de répétition	2 s
Résolution	4096 pts
Bande passante	6460 Hz

totale des noyaux étudiés, les aires sous les pics du spectre RMN sont strictement proportionnelles à la quantité des métabolites correspondants. Dans le cas de cette étude, où la séquence d'impulsion a été optimisée pour réduire le temps d'acquisition des spectres, les spins n'ont pas le temps de revenir à leur état d'équilibre et les signaux correspondant aux pics observés sont donc partiellement saturés. Il est donc nécessaire de corriger les aires calculées en fonction du facteur de saturation de chacun des pics (dépendant du T_1 de chaque métabolite). Les facteurs de correction ont été calculés à partir d'une série d'expériences spécifiques (comparaison des aires de spectres totalement relaxés (TR 17,5 s) et de spectres partiellement relaxés (TR 2 s)) pour l'ATP β (1.0), la PCr (1.2) et le Pi (1.15).

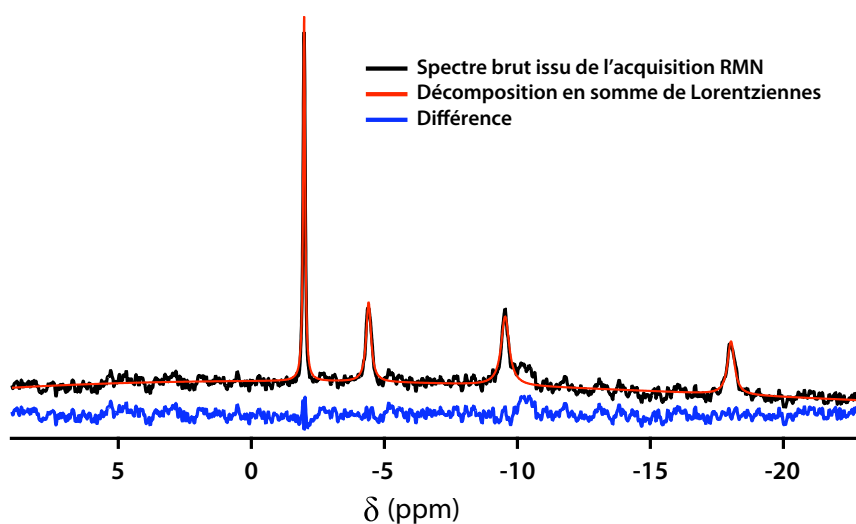


FIG. 24 – Traitement numérique des spectres RMN. Les spectres issus de l'acquisition RMN (tracé noir) sont filtrés numériquement par décomposition en somme de Lorentziennes (tracé rouge). Ce traitement permet de limiter la contribution du bruit expérimental (tracé bleu) dans le signal

MESURE DE LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE

SOMMAIRE

4.1 MONTAGE EXPÉRIMENTAL	73
4.2 TRAITEMENT DES DONNÉES	73

LA mesure de la consommation d'oxygène est un paramètre important dans l'étude de l'énergétique cardiaque sur coeur isolé perfusé, puisqu'elle permet d'apprécier l'activité mitochondriale *in situ*. Ce chapitre présente le protocole expérimental mis en place pour accéder à cette mesure dans notre étude.

4.1 MONTAGE EXPÉRIMENTAL

En parallèle des expériences RMN, la consommation d'oxygène des coeurs isolés perfusés a été mesurée. Pour ces expériences, le coeur est placé dans un bain thermostaté à 37°C (figure 25). La consommation myocardique en oxygène (MVO_2) est mesurée au moyen d'un drain, placé dans l'incision réalisée au niveau du tronc de l'artère pulmonaire, qui permet de recueillir l'effluent coronaire (figure 25). Ce dernier est aspiré à 0,5 mL/min de manière continue et circule dans la chambre de mesure d'une électrode de Clark (Modèle 781, Strathkelvin Instruments, UK) afin de doser son contenu en oxygène (figure 25).

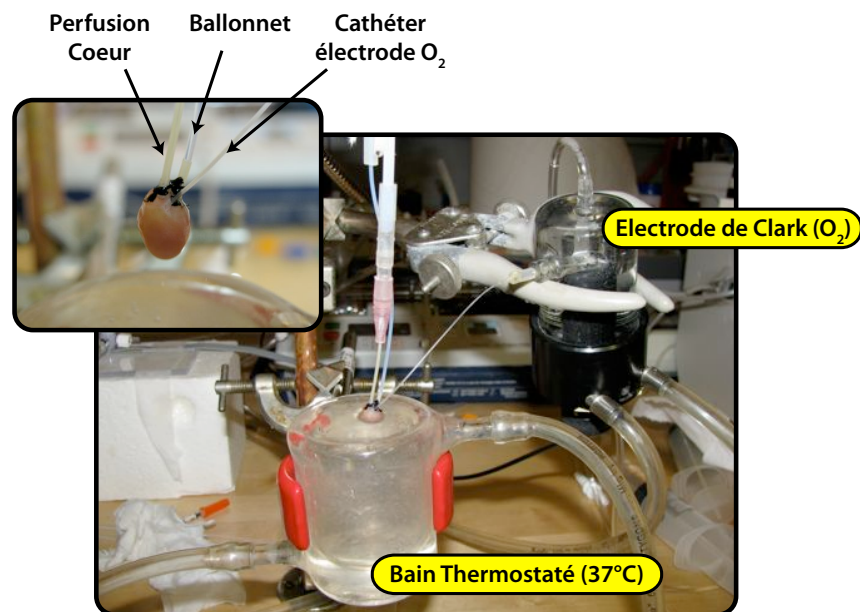


FIG. 25 – Dispositif Expérimental de Mesure de Consommation d'Oxygène.

4.2 TRAITEMENT DES DONNÉES

A l'arrêt de l'expérience, un étalonnage de l'électrode est systématiquement effectué pour pouvoir exprimer la concentration en oxygène en μM (figure 26). Cet étalonnage est basé sur les valeurs mesurées à partir d'un milieu à 25°C agité et équilibré avec l'air ambiant ($240 \mu M$ d' O_2 , B, figure 26) et d'un milieu auquel on a ajouté du dithionite ($0 \mu M$ d' O_2 , C, figure 26).

La consommation d'oxygène est alors calculé à partir de la relation 4.1 suivante :

$$MVO_2 = \frac{[O_2 \text{ perfusion}] - [O_2 \text{ effluent}]}{1000} \times \frac{Q_{cor}}{P} \quad (4.1)$$

avec :

– MVO_2 en $\mu mol O_2 \cdot min^{-1} \cdot g^{-1} \text{ poids sec}$

- O_2 perfusion, concentration en oxygène (en μMO_2) du milieu de perfusion alimentant le coeur isolé perfusé
- O_2 effluent, concentration en oxygène (en μMO_2) du milieu de perfusion en sortie du coeur (effluent coronaire)
- P , masse sèche du coeur (en g)
- Q_{cor} , débit coronaire (en $ml \cdot min^{-1}$), mesuré en continu lors des expériences

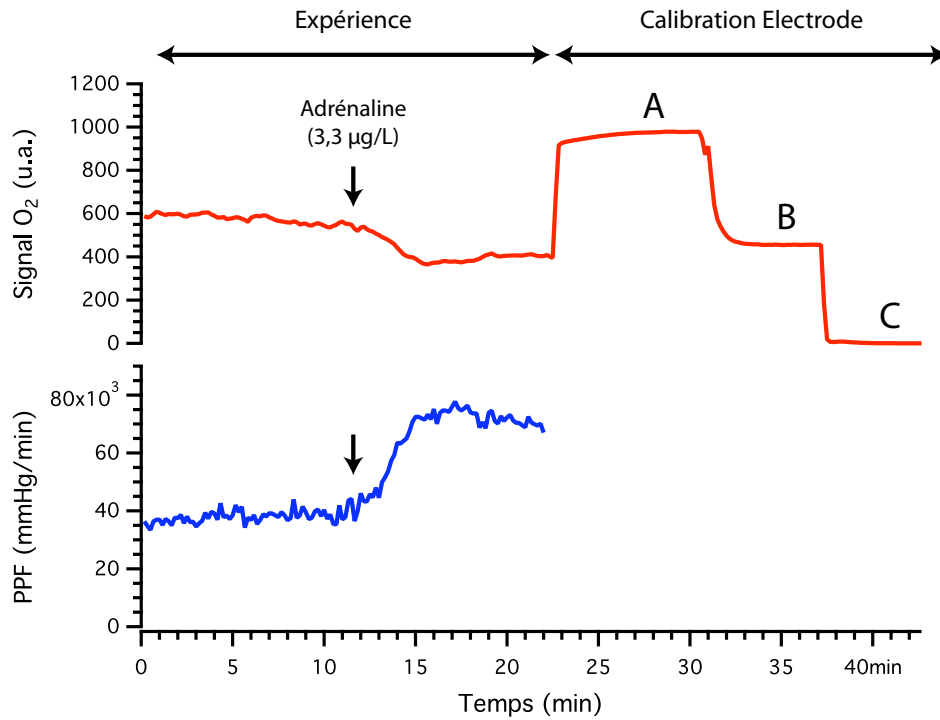


FIG. 26 – *Traces expérimentales typiques de la mesure de consommation d'oxygène des coeurs perfusés. L'enregistrement simultané de la consommation d'oxygène (trace rouge) et de l'activité contractile (trace bleue) permet d'apprécier la réponse de l'activité mitochondriale lors d'une modification de la demande énergétique (ici après une injection de 3,3 µg/L d'adrénaline). A la fin de chaque expérience, une calibration de l'électrode à oxygène est systématiquement réalisée. (A) Mesure directe de la concentration en oxygène du milieu de perfusion. (B) Concentration en oxygène du milieu équilibré avec l'air ambiant (240 µM d'O₂). (C) Concentration nulle en oxygène (ajout de dithionite dans le milieu).*

ANALYSE MODULAIRE DU CONTRÔLE MÉTABOLIQUE

5

SOMMAIRE

5.1	DÉFINITION DU SYSTÈME MODULAIRE	77
5.2	DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES ELASTICITÉS	77
5.2.1	Élasticité du Module Producteur	78
5.2.2	Élasticité du Module Consommateur	80
5.3	CALCUL DES COEFFICIENTS DE CONTRÔLES	80
5.4	ANALYSE DE RÉGULATION	80

DEPUIS plusieurs années, notre équipe contribue au développement des théories de l'Analyse du Contrôle Métabolique. Le modèle du coeur isolé perfusé est apparu comme un système très prometteur pour ce type d'étude et a permis de réaliser la première application de l'approche sur un organe entier (Diolez et al. 2002; 2007). Ce chapitre présente l'application de cette approche à l'étude du système énergétique cardiaque, à partir du modèle du coeur isolé perfusé.

5.1 DÉFINITION DU SYSTÈME MODULAIRE

La bioénergétique cardiaque peut être décomposée en modules, producteurs et consommateurs d'énergie, connectés *via* la PCr (Diolez et al. 2002; 2007) (figure 27). Le *module Producteur* comprend l'ensemble des processus permettant la génération d'énergie, c'est à dire non seulement le fonctionnement mitochondrial et glycolytique, mais également l'apport d'O₂ et de substrats. Le *module Consommateur* comprend quant à lui l'ensemble des processus consommateurs d'ATP, majoritairement l'ATPase de la myosine des myofibrilles cardiaques et les pompes ioniques impliquées dans les mouvements calciques. Notre système étant linéaire, à l'état stationnaire, tous les modules sont traversés par le même flux énergétique (accessible via la mesure de l'activité contractile, PPF) (figure 27). Un niveau d'activité contractile associé à une concentration de PCr caractérise chaque état stationnaire.

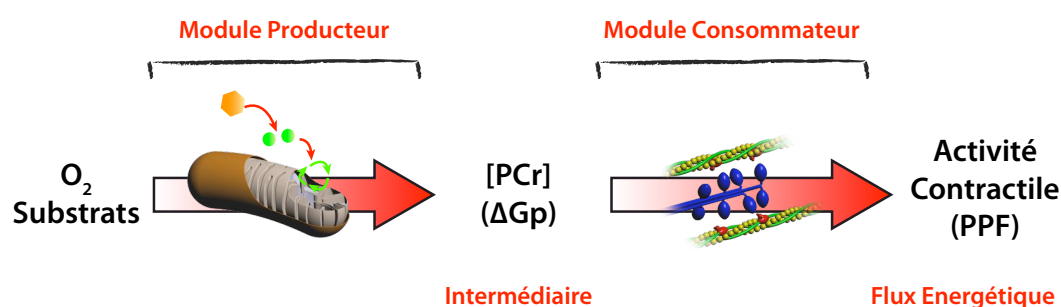


FIG. 27 – Description de l'Énergétique Cardiaque en Différents Modules.

5.2 DÉTERMINATION EXPÉRIMENTALE DES ÉLASTICITÉS

La détermination expérimentale des élasticités des modules Producteur et Consommateur est basée sur le suivi de l'activité des modules en réponse à une modification expérimentale de PCr (Diolez et al. 2007). Tout changement de [PCr] sera en effet à l'origine d'une modification de l'activité de chacun des modules. L'amplitude de cette modification, induite par le changement de [PCr], dépend de l'élasticité du module par rapport à la [PCr].

Expérimentalement, il est possible de perturber la concentration de PCr, et donc d'atteindre un nouvel état stationnaire, en modulant de manière spécifique l'activité d'un des modules, production ou consommation d'énergie. L'établissement du nouvel état stationnaire sera alors fonction du changement d'activité de l'autre module en réponse à la modification de concentration de l'intermédiaire, ce qui permet la mesure expérimentale de l'élasticité de ce module (voir sous-section 2.2.3 de l'INTRODUCTION).

Dans nos expériences, la modulation de l'activité de chacun des modules est effectuée de manière successive, ce qui nous permet d'avoir accès aux deux élasticités

pour chacun des coeurs. Cette stratégie expérimentale, dite du *One-Shot*, est basée sur l'établissement de l'état stationnaire de référence comme situation intermédiaire commune aux deux modifications (figure 28).

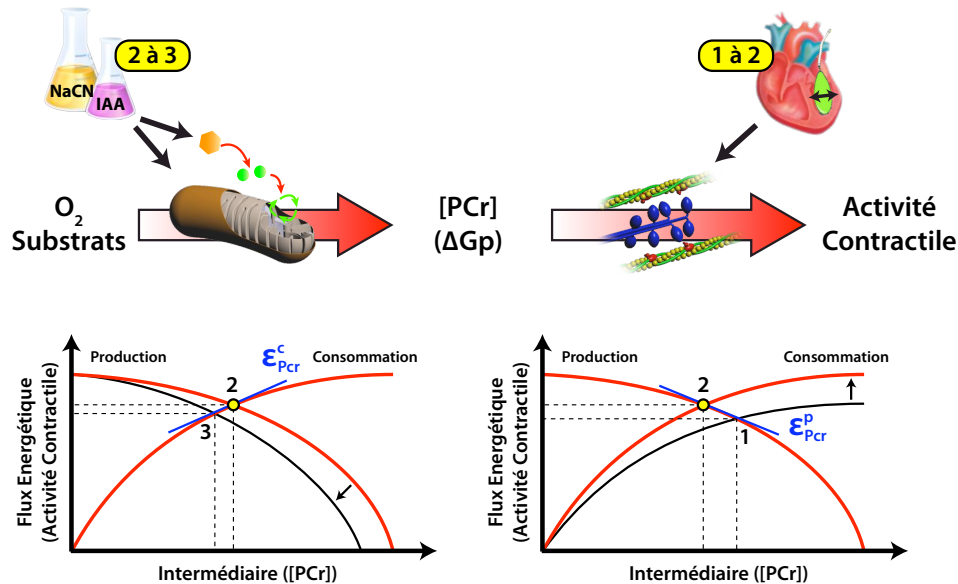


FIG. 28 – *Détermination Expérimentale des Elasticités par Méthodologie "One-Shot"*. La variation successive de l'activité du module consommateur (état stationnaire 1 à 2) puis de l'activité du module producteur (état stationnaire 2 à 3) permet de faire varier la concentration de PCr autour de l'état de référence (état stationnaire 2). La confrontation des états stationnaires 1 (sous-activité du module de demande en énergie) et 3 (inhibition de la production énergétique) par rapport à l'état stationnaire de référence donne accès au calcul de l'élasticité de chacun des modules en réponse à cette variation de [PCr]. La pente relative des tangentes à l'état stationnaire de référence (droites bleues) correspond aux élasticités de chacun des modules.

Les élasticités sont alors calculées à partir de l'équation 5.1

$$\varepsilon_{\text{PCr}}^{\text{module}} = \frac{\Delta \text{PPF} / \text{PPF}_{\text{initial}}}{\Delta [\text{PCr}] / [\text{PCr}]_{\text{initial}}} \quad (5.1)$$

Un exemple de signaux expérimentaux (spectres RMN et suivi de l'activité contractile) acquis pendant une expérience de détermination des élasticités de chacun des modules par rapport à PCr sur coeur isolé perfusé de souris est présenté en figure 29.

5.2.1 Élasticité du Module Producteur

L'élasticité du module Producteur est calculée à partir d'une perturbation de [PCr] induite par une augmentation physiologique de la contraction cardiaque via l'effet Franck Starling : l'augmentation du volume du ballonnet inséré dans le ventricule

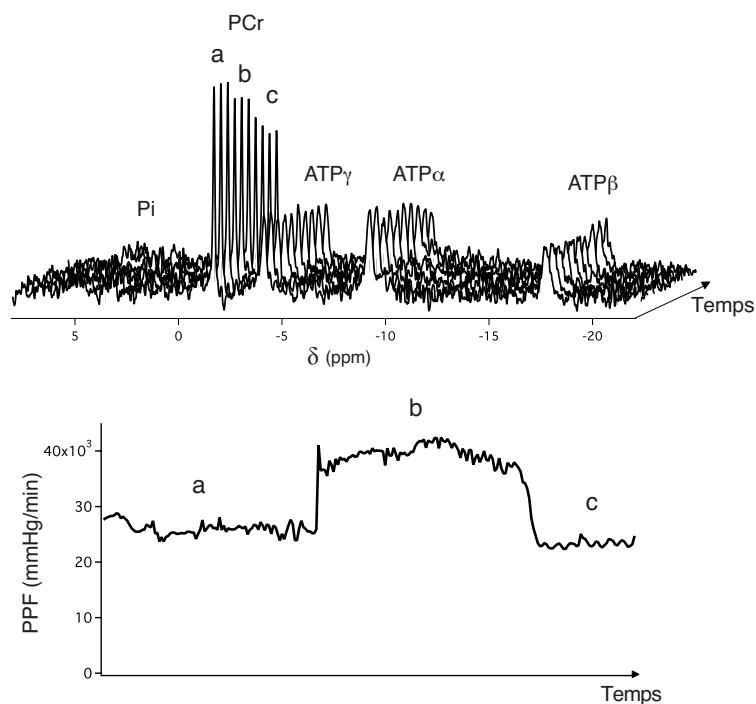


FIG. 29 – *Application expérimentale de l'Analyse du Contrôle sur cœur isolé perfusé de souris*. La mesure simultanée de l'activité contractile et de la concentration des métabolites phosphorylés pendant des perturbations spécifiques de l'activité de la production (transition $a \rightarrow b$, gonflement du ballonnet intraventriculaire) et de la consommation en énergie (transition $b \rightarrow c$, injection de NaCN + IAA) permet d'accéder à la mesure expérimentale des deux élasticités sur chaque cœur isolé perfusé. (Figure modifiée de (Calmettes et al. 2008)).

gauche du cœur (augmentation du volume télé-diastolique) entraîne un étirement des fibres musculaires cardiaques. Cet étirement a pour conséquence une augmentation de la sensibilité calcique des myofilaments (et plus particulièrement une augmentation de la sensibilité de la troponine C au calcium) ce qui conduit à une plus forte contraction (Bers 2002, Saks et al. 2006).

Dans nos expériences, cela se répercute par une légère diminution de [PCr] à laquelle est associée une augmentation de l'activité contractile (transition $a \rightarrow b$, figure 29), données à partir desquelles pourra être calculée l'élasticité du module Producteur ($\epsilon_{PCr}^{Producteur}$) d'après l'équation 5.1.

Pour assurer une perturbation comparable de la demande en énergie chez les souris contrôles et hypoxiques, le gonflement du ballonnet a été ajusté en prenant en compte la différence de volume intraventriculaire gauche, mesurée par IRM (voir l'article de Miraux et al. (2009) présenté dans la partie **RÉSULTATS**) entre ces deux populations (volume intraventriculaire gauche 20 à 25 % inférieur chez les souris hypoxiques).

5.2.2 Élasticité du Module Consommateur

Par analogie avec la sous-section 5.2.1 ci-dessus, une injection combinée de cyanure ($NaCN$) à de faibles concentrations (0,3 à 0,4 mM) et de iodoacétate (75 μM) permet de diminuer la concentration de PCr par une faible inhibition de la production d'énergie, et ainsi d'observer la réponse cinétique du module Consommateur, afin de calculer son élasticité ($\varepsilon_{PCr}^{Consommateur}$) (transition $b \rightarrow c$, figure 29). Le cyanure est un inhibiteur compétitif du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale : de par sa structure chimique identique à celle de l'oxygène, le CN^- est capable de se combiner avec le fer ferrique de la cytochrome oxydase, bloquant ainsi la respiration cellulaire (Nelson 2006). Le iodoacétate est un inhibiteur de la glycolyse au niveau de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, 75 μM étant suffisants pour inhiber près de 95 % de l'activité glycolytique (Chatham et al. 1988).

L'inhibition conjuguée des activités mitochondriale et glycolytique est nécessaire en raison de la perfusion des coeurs en double substrats (glucose - pyruvate, voir section 2.2).

5.3 CALCUL DES COEFFICIENTS DE CONTRÔLES

Les coefficients de contrôle de chacun des modules Producteur et Consommateur sur la contraction cardiaque sont directement calculés à partir des valeurs d'élasticité, d'après les équations décrites par Ainscow and Brand (1999b) et adaptées par notre équipe au modèle de l'énergétique cardiaque (Diolez et al. 2007) (équations 5.2 et 5.3).

$$C_{Producteur}^{PPF} = \frac{\varepsilon_{[PCr]}^{Consommateur}}{\varepsilon_{[PCr]}^{Consommateur} - \varepsilon_{[PCr]}^{Producteur}} \quad (5.2)$$

$$C_{Consommateur}^{PPF} = \frac{\varepsilon_{[PCr]}^{Producteur}}{\varepsilon_{[PCr]}^{Producteur} - \varepsilon_{[PCr]}^{Consommateur}} \quad (5.3)$$

5.4 ANALYSE DE RÉGULATION

Dans cette thèse, l'analyse de régulation a été utilisée pour montrer comment l'adaptation de l'énergétique cardiaque à l'hypoxie chronique (Calmettes et al. 2008) limite de manière très importante l'impact physiologique d'une baisse d'oxygène sur la fonction cardiaque (Calmettes et al. 2010).

Les équations permettant de décrire le changement d'état stationnaire des coeurs isolés perfusés en quantifiant l'ensemble des effets induits par la diminution d'oxygène sur chacun des modules de notre système (voir section 5.1) ont été directement adaptées de Ainscow and Brand (1999a) et Diolez et al. (2007). Les effets de la baisse d'oxygène sur l'énergétique cardiaque ont été quantifiés en termes d'*effet direct*, d'*effet indirect* et d'*effet global* sur les modules.

L'effet indirect correspond à la modification d'activité du module en réponse au changement de [PCr] après la baisse de la concentration en oxygène. Cet effet est donc dépendant de l'élasticité du module par rapport à [PCr] (equation 5.4).

$$\text{Effet Indirect} = \varepsilon_{[\text{PCr}]}^{\text{module}} \times \frac{\Delta[\text{PCr}]_{\text{baisse d'oxygène}}}{[\text{PCr}]_{\text{initial}}} \quad (5.4)$$

L'effet direct sur chaque module quantifie l'effet propre de la diminution d'oxygène sur chacun des modules. Son calcul implique donc l'effet total observé sur l'activité de l'ensemble des modules du système induit par la baisse d'oxygène ($\frac{\Delta PPF_{\text{baisse d'oxygène}}}{PPF_{\text{initial}}}$) auquel on soustrait l'effet indirect (equation 5.5).

$$\text{Effet Direct} = \frac{\Delta PPF_{\text{baisse d'oxygène}}}{PPF_{\text{initial}}} - \varepsilon_{[\text{PCr}]}^{\text{module}} \times \frac{\Delta[\text{PCr}]_{\text{baisse d'oxygène}}}{[\text{PCr}]_{\text{initial}}} \quad (5.5)$$

Enfin, la multiplication de cet effet direct de la baisse d'oxygène sur un module par le coefficient de contrôle de ce module sur le flux de notre système donne accès à l'effet global de la baisse d'oxygène sur le système via ce module (equation 5.6).

$$\text{Effet Global} = C_{\text{module}}^{\text{PPF}} \times \frac{\Delta PPF_{\text{baisse d'oxygène}}}{PPF_{\text{initial}}} - \varepsilon_{[\text{PCr}]}^{\text{module}} \times \frac{\Delta[\text{PCr}]_{\text{baisse d'oxygène}}}{[\text{PCr}]_{\text{initial}}} \quad (5.6)$$

DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA CITRATE SYNTHASE

6

SOMMAIRE

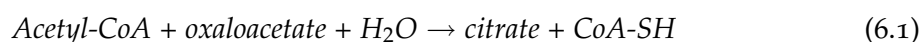
6.1 PRINCIPE DE LA MESURE	85
6.2 PROTOCOLE	85
6.2.1 Préparation de l'Échantillon	85
6.2.2 Mesure par Spectrophotométrie	85
6.2.3 Calcul de l'Activité de la Citrate Synthase	86

LA Citrate Synthase est une enzyme du cycle de Krebs, localisée dans la matrice mitochondriale. De ce fait, son dosage est communément utilisé comme marqueur de la masse mitochondriale dans un tissu (Holloszy et al. 1970). Dans notre étude, ce marqueur nous a permis d'évaluer les modifications du contenu mitochondrial cardiaque induites par l'exposition à l'hypoxie chronique.

6.1 PRINCIPE DE LA MESURE

La Citrate Synthase est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la formation de citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétyl-CoA (réaction 6.1).

Le dosage de son activité fait intervenir l'acide 5,5-Dithiobis-(2-Nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB réagit avec les groupements thiols (SH) du CoA-SH issus de la réaction 6.1 et forme du CoA-S-TNB et du TNB (réaction 6.2). Ce dernier est un composé jaune qui absorbe la lumière à 412 nm.



Le dosage consiste à suivre spectrophotométriquement la formation de TNB à 412 nm qui est directement proportionnelle à l'activité de la Citrate Synthase, selon la méthode décrite par Srere (1969).

6.2 PROTOCOLE

A la fin de chaque expérience, les coeurs de souris Contrôles et Hypoxiques sont rapidement congelés dans l'azote liquide par la technique classique de *freeze-clamp* puis stocké à -80°C en vue des analyses enzymatiques ultérieures.

6.2.1 Préparation de l'Échantillon

Après décongélation, les tissus sont émincés à l'aide de ciseaux, puis repris (1 mL pour 50 mg de tissu) dans une solution tampon de Tris-HCl (0,1 mM) - EGTA (1 mM) dont le pH a été préalablement ajusté à 8,1.

Cette préparation est homogénéisée à l'Ultra-Turrax, puis mise en incubation à 0°C pendant 60 min pour favoriser une extraction enzymatique complète. Les homogénats sont ensuite centrifugés pendant 20 min à 13000 g. Le surnageant est utilisé pour le dosage de l'activité de la Citrate Synthase.

6.2.2 Mesure par Spectrophotométrie

L'ensemble des mesures enzymatiques a été réalisé à 30 °C. 15 µL d'échantillon sont ajoutés à un mélange réactionnel (voir composition dans le tableau 3) dans une microcuve de mesure à usage unique (CML, Nemours, France). La cuve de mesure est placée dans un spectrophotomètre (Carry 50, Varian) et la cinétique d'augmentation de l'absorbance du TNB à 412 nm est enregistrée pendant 3 min (figure 30).

Pour chaque échantillon, trois mesures sont enregistrées (figure 30).

TAB. 3 – Réactifs utilisés pour le dosage de la Citrate Synthase

Réactifs	Volume ajouté	Concentration finale
DTNB (1 mM)	100 μL	0,1 mM
Triton X-100 (10 %)	25 μL	0,25 %
Oxaloacétate (10 mM)	50 μL	0,5 mM
Acétyl-CoA (10 mM)	25 μL	0,25 mM
Échantillon		15 μL
Eau distillée	785 μL (complétion à 1 mL)	

6.2.3 Calcul de l'Activité de la Citrate Synthase

L'activité de la Citrate Synthase est calculée suivant la formule 6.3.

$$v_{CS} = \frac{r_A}{l \cdot \epsilon_{TNB} \cdot \nu_{TNB}} \cdot \frac{V_{cuvette}}{V_{\text{échantillon}} \cdot \rho} \quad (6.3)$$

avec :

- v_{CS} , activité spécifique de la Citrate Synthase (en $\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$)
- r_A , vitesse de changement d'absorbance mesurée (en min^{-1})
- l , longueur traversée par le faisceau optique (ici 1 cm)
- ϵ_{TNB} , coefficient d'extinction du TNB réduit à 550 nm et pH 6,5 (soit $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- ν_{TNB} , nombre stochiométrique du TNB dans la réaction 6.2 (soit 1)
- $V_{cuvette}$, volume de solution dans la cuvette (1000 μL)
- $V_{\text{échantillon}}$, volume d'échantillon ajouté (15 μL)
- ρ , concentration protéique de l'échantillon

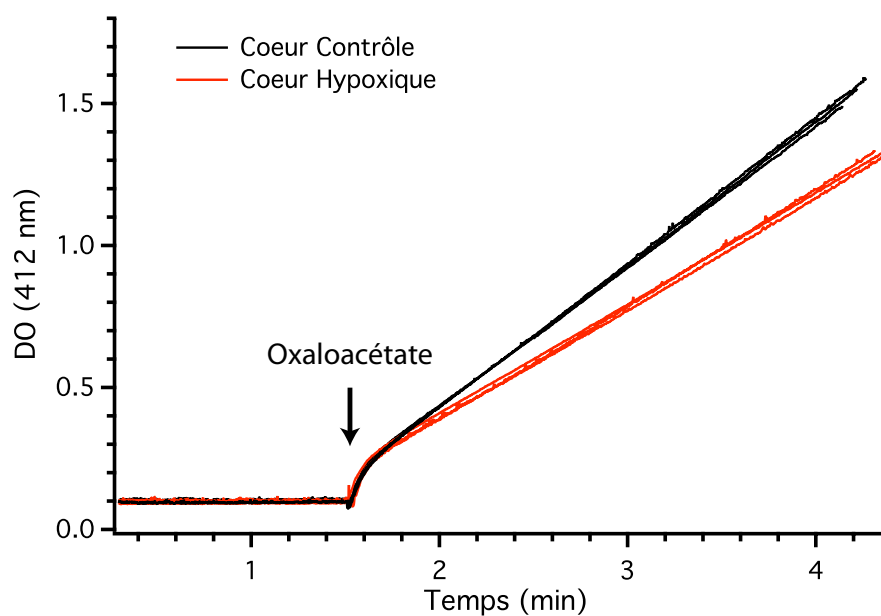


FIG. 30 – *Mesure par spectrophotométrie de l'activité de la citrate synthase sur extrait de coeur.* Après ajout des réactifs, la cinétique d'augmentation de l'absorbance du TNB à 412 nm est enregistrée en continu pendant ≈ 3 min. La mesure est répétée 3 fois pour chaque échantillon. Des exemples de mesures réalisées sur un échantillon issu d'un coeur contrôle (tracés noirs) ou d'un coeur hypoxique (tracés rouges) sont présentés dans cette figure.

Troisième partie

RÉSULTATS

CARACTÉRISATION DU MODÈLE HYPOXIQUE MURIN

1

1.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le travail présenté dans cette thèse est la première application de l'analyse MoCA sur un modèle de coeur ayant développé une pathologie (modèle du coeur de souris hypobares). La première étape a donc été la caractérisation, notamment anatomique, du modèle du coeur hypoxique utilisé dans nos expériences.

Cette caractérisation est en effet importante, non seulement pour valider le modèle utilisé (et s'assurer que notre protocole d'hypoxie chronique induit bien les modifications correspondant à ce qui est décrit dans la littérature), mais également pour appliquer notre analyse MoCA. En effet, dans cette approche, la détermination expérimentale des élasticités est basé sur l'induction d'une modification de l'activité des modules de production et de consommation d'énergie afin de faire varier la concentration de PCr et ainsi accéder à la réponse de l'autre module face à cette perturbation. En particulier, la modulation de l'activité du module Consommateur est réalisée par une augmentation du volume du ballonnet inséré dans le ventricule gauche du coeur (effet Frank Starling).

Étant donné la modification globale de l'anatomie cardiaque induite par l'hypoxie chronique avec notamment un remodelage des deux ventricules, la connaissance précise des modifications géométriques et volumétriques induites par cette situation est d'une grande importance pour assurer des modifications comparables de la contraction entre les deux populations de souris.

Une collaboration interne au laboratoire avec l'équipe *Concepts et Soutiens Méthodologiques* (en particulier Sylvain Miraux et Éric Thiaudière), nous a permis d'accéder à la description des modifications anatomiques cardiaques (volumes des masses myocardiques des ventricules, et volumes intraventriculaires) induites par l'exposition à l'hypoxie chronique, grâce au développement d'une séquence IRM TrueFISP sang noir particulièrement adaptée pour ces mesures.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans la revue *Magnetic Resonance in Medicine* :

"4D RETROSPECTIVE BLACK BLOOD TRUEFISP IMAGING OF MOUSE HEART"

Sylvain Miraux, **Guillaume Calmettes**, Philippe Massot, William Lefrançois, Élodie Parzy, Bernard Muller, Laurent M. Arzac, Véronique Deschodt-Arsac, Jean-Michel Franconi, Philippe Diolez et Éric Thiaudière

Magnetic Resonance in Medicine. 2009 Nov ;62(5) :1099-105

1.2 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

L'objectif de cette étude est de démontrer l'intérêt d'une séquence haute résolution d'IRM TrueFISP 4 dimensions pour les mesures volumétriques cardiaques. Des images 3 dimensions résolues dans le temps (Ciné 3D) de souris contrôles et hypoxiques ont été acquises à 4.7T sans préparation d'aimantation ni de synchronisation prospective à partir de l'électrocardiogramme. Les lignes de l'espace K ont été complétées par la répétition séquentielle d'une séquence TrueFISP (temps de répétition / temps d'écho = 4 / 2 ms). La reconstruction de 10 images 3 dimensions par cycle cardiaque à partir des données acquises a été faite de manière rétrospective. La séquence utilise la méthode des impulsions radiofréquences par phases alternées associée à une reconstruction par racine carrée de la somme des carrés. Des images 3 dimensions sang noir avec une résolution d'environ 200 μm (dans les 3 axes de l'espace) ont été produites sans artefact pendant le cycle cardiaque. Le rapport signal sur bruit élevé permet d'estimer les volumes des cavités ventriculaires aussi bien lors de la phase de diastole que de systole. Les volumes de sang éjectés par le ventricule droit et gauche étaient significativement supérieurs chez les souris hypoxiques comparé aux souris contrôles (20.2 ± 2 vs 15.1 ± 2 ; 24.9 ± 2 vs 20.4 ± 2 ; $P < 0.05$). En conclusion, l'application de la séquence TrueFISP sang noir 4 dimensions sur des souris vivantes est une technique de choix pour étudier les anomalies cardiaques développés dans les modèles murins.

1.3 ARTICLE 1

Cet article correspond à la référence ([Miraux et al. 2009](#)).

4D Retrospective Black Blood TrueFISP Imaging of Mouse Heart

Sylvain Miraux,^{1*} Guillaume Calmettes,¹ Philippe Massot,¹ William Lefrançois,¹ Elodie Parzy,¹ Bernard Muller,² Laurent M. Arzac,¹ Véronique Deschodt-Arsac,¹ Jean-Michel Franconi,¹ Philippe Diolez,¹ and Eric Thiaudière¹

The purpose of this study was to demonstrate the feasibility of steady-state True fast imaging with steady precession (TrueFISP) four-dimensional imaging of mouse heart at high resolution and its efficiency for cardiac volumetry. Three-dimensional cine-imaging of control and hypoxic mice was carried out at 4.7 T without magnetization preparation or ECG-triggering. The *k*-space lines were acquired with the TrueFISP sequence (pulse repetition time/echo time = 4/2 ms) in a repeated sequential manner. Retrospective reordering of raw data allowed the reconstruction of 10 three-dimensional images per cardiac cycle. The acquisition scheme used an alternating radiofrequency phase and sum-of-square reconstruction method. Black-blood three-dimensional images at around 200 μ m resolution were produced without banding artifact throughout the cardiac cycle. High contrast to noise made it possible to estimate cavity volumes during diastole and systole. Right and left ventricular stroke volume was significantly higher in hypoxic mice vs controls (20.2 ± 2 vs 15.1 ± 2 ; $P < 0.05$, 24.9 ± 2 vs 20.4 ± 2 ; $P < 0.05$, respectively). In conclusion, four-dimensional black-blood TrueFISP imaging in living mice is a method of choice to investigate cardiac abnormalities in mouse models. Magn Reson Med 62:000–000, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: TrueFISP; black blood; retrospective gating; mouse heart; cine-3D

Owing to the many possibilities offered by transgenic and surgical approaches, numerous models of cardiovascular diseases have been developed in mouse. This provides not only a better understanding of physiology but is also of great use in preclinical trials, e.g., gene therapy or pharmacological treatment.

MRI has become a reference noninvasive tool to characterize variations in structure and function of mouse heart. Until now, most of the MR studies on mouse models were performed with two-dimensional white-blood cine-imaging combined with cardiac triggering for MR acquisition synchronization (1–4). Parameters like end-systolic and end-diastolic volumes can be measured in order to evaluate both stroke volume and ejection fraction. Nevertheless, routine MRI techniques suffer from many drawbacks. First of all, two-dimensional imaging results in a limited spatial resolution in the slice dimension. In fact, typical out-of-

plane resolutions are in the range of 1 mm, whereas mouse heart does not exceed 10 mm in the long axis. This could result in measurement errors due to a partial volume effect.

To overcome this issue, some authors have shown interest in performing four-dimensional (4D) (three-dimensional [3D]-cine) imaging (5–7). Feintuch et al. (6) demonstrated the feasibility of 4D mouse imaging with an isotropic spatial resolution of 200 μ m. Nevertheless, scan times were very long (between 80 and 120 min) for bright blood imaging. More recently, Bucholz et al. (7) presented impressive images with exceptional resolution (80 μ m), but injection of a nonconventional liposomal gadolinium contrast agent was required. The other drawback of such experiments is that, in many cases, images are acquired with a bright blood contrast. It is now widely accepted that MR sequences with suppression of the blood signal (black or dark blood sequence) are more appropriate to reduce interobserver variability in the drawing of epicardial and endocardial borders (8), and consequently allow more accurate estimation of the physiologic parameters of the heart. Among the many black-blood imaging methods that have been developed in mouse models and in humans (9–13), most of them required the implementation of a preparation module (spatial presaturation, motion sensitizing gradients, or double inversion recovery). However, magnetization preparation has some disadvantages, especially the need to increase the pulse repetition time (TR) of the sequence. Moreover, this makes it difficult to use fast steady-state free precession, particularly on small animal models when the duration between two R-waves is lower than 200 ms.

Steady-state free precession–based imaging (14), particularly TrueFISP (also called balanced steady state free precession (bSSFP) or fast imaging employing steady state acquisition (FIESTA), can play a key role in clinical heart imaging (15) because of high signal-to-noise and contrast-to-noise ratios. Nowadays, they are even used in 4D white-blood imaging in humans, where a complete cardiac cycle can be acquired in a single breath hold (16–18). Unfortunately, the TrueFISP sequence is very sensitive to local field variations, resulting in characteristic banding artifacts. This explains why it is seldom employed at high field, particularly on small animals. However, by combining an alternating radiofrequency (RF) phase method and sum-of-square reconstruction (19,20), it has recently been shown that high-resolution 3D images can be viewed at 4.7 T and 9.4 T in mouse brain, with high contrast and with a much reduced scan time compared to a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) 3D sequence (20).

¹Centre de Résonance Magnétique des Systèmes biologiques, UMR 5536 CNRS/Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

²Laboratoire de Pharmacologie de l'UFR Pharmacie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U885, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

*Correspondence to: Sylvain Miraux, CNRS/UVSB2, 146, rue Leo Saignat, Bordeaux, 33076, France. E-mail: miraux@rmsb.u-bordeaux2.fr

Received 4 February 2009; revised 18 June 2009; accepted 19 June 2009.

DOI 10.1002/mrm.22139

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2009 Wiley-Liss, Inc.

The goal of this study was to perform TrueFISP (alternating RF pulse phase with sum-of-square reconstruction) in order to acquire black-blood 3D cine images of mouse heart. Images without ECG triggering were acquired at 4.7 T with retrospective rearrangement. The method was employed to accurately define cardiovascular anatomy and function of control mice and to describe changes induced by exposure to chronic hypoxia.

MATERIALS AND METHODS

Magnet and Gradient System

Experiments were carried out on a horizontal 4.7-T Biospec system (Bruker, Ettingen, Germany). The system was equipped with a 6-cm gradient insert capable of 950 mT/m maximum strength and 80 μ s rise time. Measurements were performed with a mouse-dedicated birdcage cross-polarization resonator, 25 mm in diameter and 60 mm long, tuned to 200.3 MHz.

Animal Preparation

Female mice (C57 black 6, mean body weight = 20 ± 0.6 g) were separated into two groups. One group (chronic hypoxia) was exposed to a simulated altitude of 5500 m (barometric pressure 380 mmHg) in a well-ventilated, temperature-controlled hypobaric chamber for 28 days. The chamber was opened briefly three times a week for household cleaning and feeding. The other group (normoxic mice, control) was maintained under ambient normoxic conditions, with the same 12:12-h light-dark cycles. Free access to a standard mouse diet and water was allowed throughout the exposure period (21). The investigation conformed to the National and European Research Council Guide for the care and use of laboratory animals.

For MRI investigation, mice were anesthetized with 1.5-2% isoflurane (Centravet, La Palisse, France) mixed in air. The ECG signal was picked up by electrodes placed on the forelimbs. When the R-wave was detected, a square pulse (2-ms duration) was generated by a dedicated monitoring system (SA Instruments, Inc., NY, USA) and recorded on a data acquisition system at a sampling frequency of 10 kHz (Powerlab, AD Instruments, Bella Vista, Australia).

Visualization of ECG via a user interface allowed cardiac rhythm stabilization (475-525 beats/min) by modifying the percentage of isoflurane.

The animals were positioned supine within the magnet, with the heart placed at the center of the NMR coil. The total experiment time for one mouse was approximately 75 min (10 min preparing, 5 min for MRI adjustments, and 60 min for 4D MRI).

MRI Parameters

Four sets of 48 sequential repetitions of nontriggered, non-selective, coronally orientated 3D TrueFISP were performed: echo time/TR = 2/4 ms; excitation pulse: hermite (410 μ s), flip angle: 65°; field of view: 35 \times 19 \times 16 mm; matrix: 192 \times 94 \times 48; spatial resolution: 182 \times 202 \times 333 μ m; reception bandwidth: 77,519 Hz (404 Hz/pixel).

Total acquisition time for one set was 14 min 26 sec.

As previously described (20), each data set was acquired with a specific difference in phase ($\Delta\Phi$) between consecutive RF pulses ($\Delta\Phi = 180^\circ, 0^\circ, 90^\circ, 270^\circ$).

Each acquired line of the k -space was separately recorded for retrospective reconstruction of the cine images.

At each TR, a 410 μ s TTL signal was generated by the spectrometer and recorded by the four-channel data acquisition system (Powerlab, AD Instruments).

Black-Blood Contrast

Black-blood contrast was obtained without any preparation module, thanks to whole-body imaging acquisition. Since the 3D imaging volume encompassed the RF excitation region, no time-of-flight effect was expected. High flip angle and short repetition time were used to achieve complete saturation of blood signal.

Retrospective 4D image reconstruction

Images (Fig. 1) were reconstructed with homemade software developed on Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR).

Each line (echo) of the k -space of 3D data sets was characterized by its $\Delta\Phi$, its phase-encoding gradient, its slice-encoding gradient, and its time delay following the R-wave peak, as monitored by the data acquisition system. The k -space lines were appropriately rearranged into 3D matrices, each of them having its $\Delta\Phi$ and its time delay with respect to the R-wave. Here, 10 time delays were defined throughout the cardiac cycle. For each time delay, four matrices corresponding to the four $\Delta\Phi$ values were recombined by the sum-of-square method after Fourier transformation.

About 30 echoes were acquired between two consecutive RR waves and 48 acquisitions of the 3D data sets were carried out. As the k -spaces lines were statistically filled, many lines were acquired several times and their signal was averaged accordingly. The probability of having empty lines in 3D matrices at a given time delay was less than 1%.

Volume Analysis

Volume analysis was performed with a semiautomated segmentation procedure on Amira (Visage Imaging GmbH, Germany) to calculate left ventricular end-diastolic volume, left ventricular end-systolic volume, left ventricular stroke volume, left ventricular ejection fraction, right ventricular end-diastolic volume, right ventricular end-systolic volume, right ventricular stroke volume, and right ventricular ejection fraction. Right ventricle and left ventricle + septum volumes were also assessed by MRI and compared to wet muscle mass, as assessed from excised heart dissection and weighting.

Steady-State Magnetization Simulations

Simulations of the state of magnetization with TrueFISP and gradient echo sequences using ERNST angle were performed with Igor Pro using well-known equations (see Appendix).

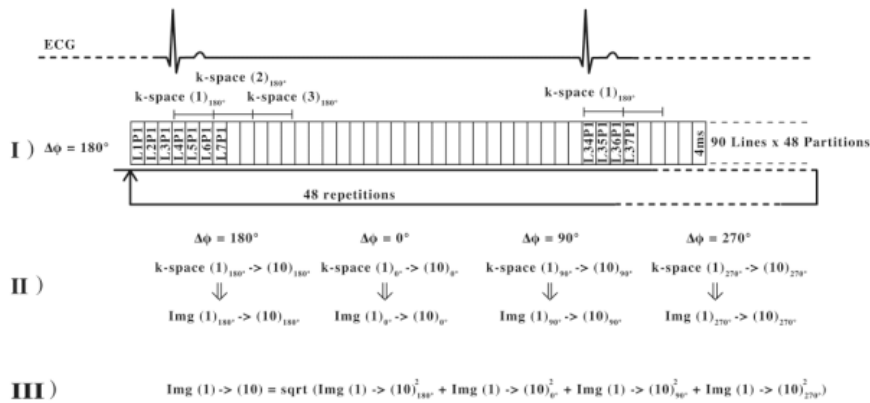


FIG. 1. Schematic diagram of acquisition and reconstruction of retrospective 3D cine TrueFISP cardiac imaging. **I:** 3D TrueFISP matrix was acquired 48 times for a given value of $\Delta\Phi$ (here 180°). The same protocol was repeated for $\Delta\Phi = 0^\circ, 90^\circ$ and 270° . The k -spaces are denoted as LiPj, where L stands for the phase-encoding step and P the partition-encoding step. Here around 30 echoes were recorded during an R-R interval. **II:** The k -space data were rearranged as a function of time and averaged to build 10 3D matrices in one R-R interval for a given $\Delta\Phi$ value. The same rearrangement was carried out for the other values of $\Delta\Phi$. **III:** Sum-of-square reconstruction of the 10 images from each $\Delta\Phi$ value.

Statistical Analysis

Values are given as mean \pm SD (n : number of animals). Cardiac parameters were compared by one-way analysis of variance. Statistical significance was considered for a P value lower than 0.05.

RESULTS

Black-blood 3D cine TrueFISP of the mouse heart was carried out at 4.7 T by using retrospective ECG-gating combined with the method of linear combination of alternating RF phase acquisitions and sum-of-square reconstruction.

Since the TrueFISP sequence is known to yield a high signal-to-noise ratio (SNR), particularly for tissue with long T_2 , simulations of the steady-state magnetization obtained with TrueFISP for the myocardium were performed and compared to a classic gradient echo sequence. Simulations were performed for a tissue with $T_1 = 1300$ ms and $T_2 = 50$ ms. T_1 and T_2 values were selected from literature data (22,23).

As described in Fig. 2, simulations of the stationary state showed that at TR = 4 ms, the stationary state magnetization with TrueFISP was 1.47-fold higher compared to a gradient echo at the Ernst angle. Based on these simulations, therefore, TrueFISP with high flip angle was used for cardiac imaging.

Retrospective gating without ECG triggering of the pulse sequence was essential to maintain a stationary state during the whole experiment, a requisite of TrueFISP imaging. The ECG signal was recorded concomitantly with the NMR signal in order to assign the position of each acquired k -space line in the cardiac cycle.

First, the k -space volume (matrix: $192 \times 94 \times 48$) was acquired 48 times, with a value $\Delta\Phi = 180^\circ$. In general, the heart rate in both groups ranged from 475 to 525 beats/min, resulting in a $T_{R-R} = 115$ -125 ms. The TR of the sequence was equal to 4 ms and to improve the SNR, three

successive lines were used to reconstruct the 3D image corresponding to a given time point. Therefore, the temporal resolution became 12 ms, thereby allowing the reconstruction of about 10 cine images.

Figure 3a and b shows two views (axial and coronal) of a 3D image at end systole, obtained with the value $\Delta\Phi = 180^\circ$. On these images, the blood signal appears completely suppressed in the ventricles and only the myocardium is visible. Subcutaneous fat appears hyperintense. Despite a high SNR (≈ 15), the poor magnetic field homogeneity induced a band of signal loss. This banding artifact prevented interpretation and estimation of the cardiac volume.

Therefore, three more sets of images were acquired with values of $\Delta\Phi = 0^\circ, 90^\circ, 270^\circ$ and were reconstructed with

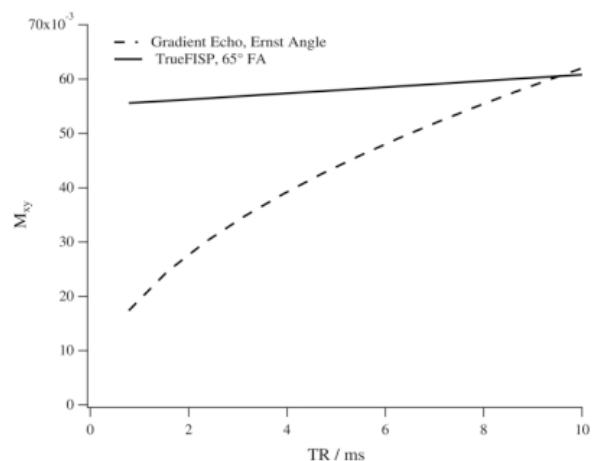


FIG. 2. Simulations of magnetization equilibrium state with TrueFISP ($\alpha = 65^\circ$) and gradient echo at the Ernst angle for a tissue with $T_1 = 1300$ ms and $T_2 = 50$ ms.

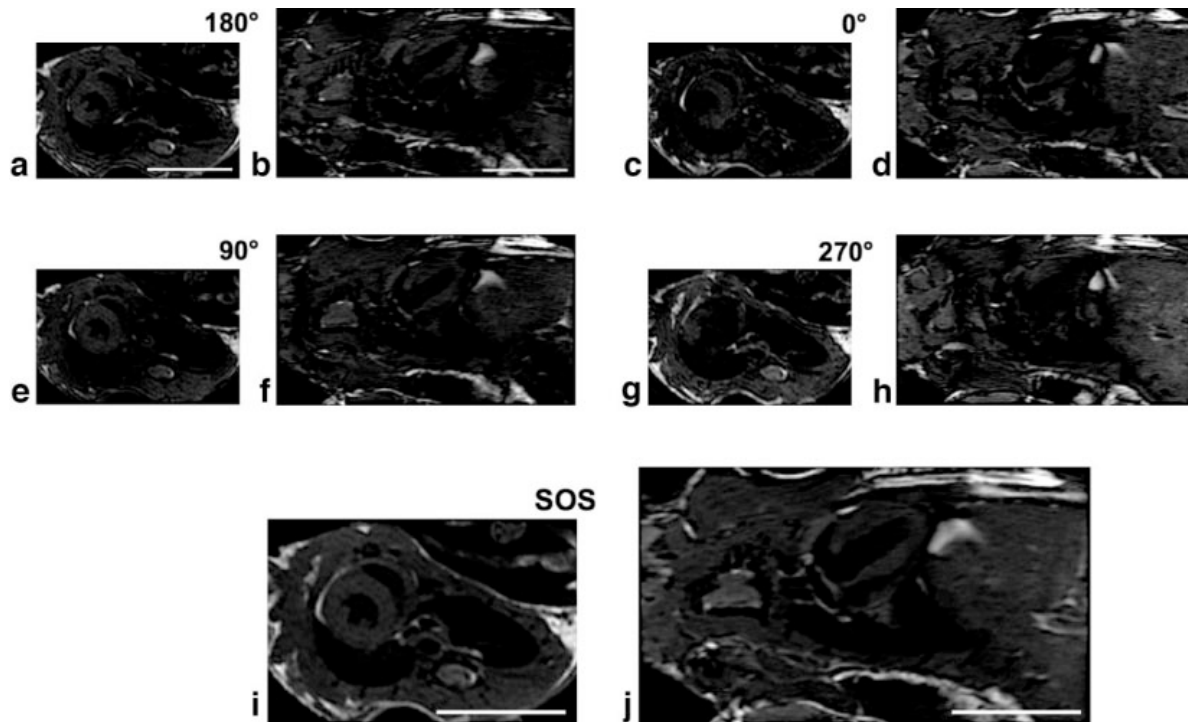


FIG. 3. Extracted views (axial and coronal) of 4D images obtained with TrueFISP $\Delta\Phi = 180^\circ$ (a,b), 0° (c,d), 90° (e,f), and 270° (g,h) and final views obtained after sum-of-square reconstruction (i,j). Scale bars represent 1 cm.

the sum-of-square method. Images are shown in Fig. 3i,j. They appear artifact free and with a very good black-blood contrast. The SNR of the myocardium region was then around 26.

Figure 4 shows the series of 10 cardiac 3D cine images in two orientations (short and long axis). Image quality was constant (SNR of myocardium and blood suppression) throughout the cardiac cycle. Both ventricles were easily

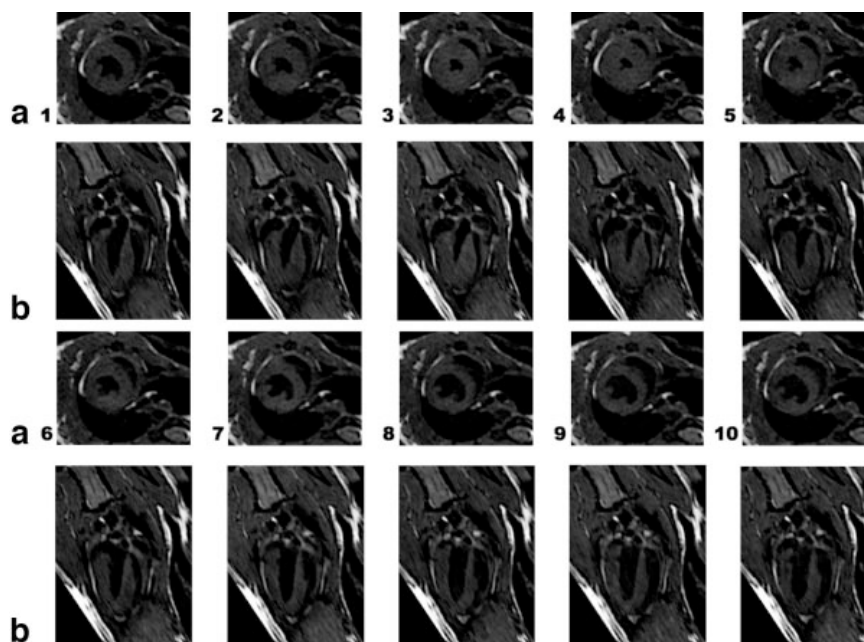


FIG. 4. Magnified short axis (line A) and long axis (line B) views from 3D images obtained after reconstruction of the 10 phases of the cardiac cycle of a normal mouse. Movies of normal mouse beating heart are available as supplementary materials.

Table 1
Quantitative Measurements of Left and Right Ventricles in Normal and Hypoxic Mice

	LVEDV (μL)	LVESV (μL)	LVSV (μL)	LVEF (%)	RVEDV (μL)	RVESV (μL)	RVSV (μL)	RVEF (%)
Normoxic mice ($n = 6$)	35 \pm 3	10.1 \pm 2	24.9 \pm 2	71.1 \pm 3	24.3 \pm 2	9.2 \pm 2	15.1 \pm 2	62.1 \pm 3
Chronic hypoxic ($n = 5$)	28.8 \pm 3*	8.4 \pm 2	20.4 \pm 2*	70.8 \pm 3	31.8 \pm 2*	11.6 \pm 2	20.2 \pm 2*	63.5 \pm 3

LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESV, left ventricular end-systolic volume; LVSV, left ventricular stroke volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; RVEDV, right ventricular end-diastolic volume; RVESV, right ventricular end-systolic volume; RVSV, right ventricular stroke volume; RVEF, right ventricular ejection fraction. * $P < 0.05$ (analysis of variance test).

delineated, and their volume could be measured after semiautomated segmentation. The control values of end-diastolic, end-systolic, stroke volume, and ejection fraction of both ventricles given in Table 1 are in agreement with values already reported in the literature (6-8).

The same technique was applied on hypoxic mice ($n = 5$), an animal model developing the same cardiac changes as observed in humans during severe chronic obstructive pulmonary disease, hypoxemic congenital heart disease, or high-altitude living. Figure 5 shows images of a hypoxic mouse heart. The left ventricular cavity volume appears slightly decreased on the image, the right ventricle appears bigger during the end of systole, and the right ventricle wall (see arrow in Fig. 5b) seems thicker compared to that in control mice. The values in Table 1 show a significant difference in left ventricular end-diastolic volume, left ventricular stroke volume, right ventricular end-diastolic volume and right ventricular end-systolic volume.

Myocardium region could also be manually segmented, and volumes measured by MRI were compared to wet muscle mass of excised dissected hearts. The values are reported in Table 2 and show significant difference in right ventricle volume measured between control and hypoxic mice. This difference was confirmed from ex vivo weighing of dissected hearts.

A movie of normal mouse beating heart is available at http://www.rmsb.u-bordeaux2.fr/rmsb/Recherche/Pages-Perso/Sylvain/ImagFonc/Imagerie_4D_cardiaque.html.

DISCUSSION

High-resolution 3D cine black-blood cardiac imaging in living mice was carried out in the present study. In terms of spatial resolution, 3D imaging can bring a significant advantage over conventional two-dimensional imaging, especially in mouse heart that has an overall size of about 200 μL . In separate experiments (not shown) carried out on a 235- μL water phantom, it was shown that errors in volume measurements were lower (4%) in 3D imaging

with a voxel size of $192 \times 200 \times 333$ (μm)⁽³⁾ than in two-dimensional images with pixel size of 100×100 (μm)⁽²⁾ and a slice thickness of 1 mm (9%). Thus, there is a strong interest in using nearly isotropic voxels in assessing the volume of tiny structures.

Here, the TrueFISP sequence was used at high field. Several key points are required to obtain such high-quality images. First of all, a coil irradiating most of the body (approximately 8 cm long) is necessary to suppress blood signal at the cardiac level and in vessels. In this study, the coil length was 6 cm and blood signal was efficiently saturated. By contrast, when the same acquisition parameters were used with a 30-mm-long coil, the blood appeared hyperintense in some areas of the heart ventricles. This is due to the time-of-flight effect generated by the RF gradient of the small coil.

To limit the time-of-flight effect, the slice thickness should encompass the whole animal. Of course, this kind of 3D "whole-body" acquisition requires a large matrix size in the third dimension to conserve a high spatial resolution and consequently increases the total scan time. An advantage, however, is that no particular slice positioning is required and that images in different orientations (long and short axis) can be reconstructed a posteriori.

The last reason for a good black-blood contrast was the use of a short TR and a high flip angle (65°). Blood is characterized by a long T_1 compared to other tissues and was thus well saturated. The main advantage of the technique is that no preparation is necessary to cancel blood magnetization.

A much-debated issue about using gradient echo sequences with short TR and a high flip angle is the low stationary state magnetization achieved, thus limiting the SNR. For this reason, TrueFISP acquisition was preferred to FLASH or FISP sequences. As shown in Fig. 2, TrueFISP makes it possible to obtain a stationary state magnetization 1.5-fold higher than with a FLASH sequence at the Ernst angle (and 10-fold higher with a FLASH sequence at 65°

FIG. 5. Three extracted short axis views of a hypoxic mouse heart (end diastole (a), end systole (b)). Arrows show wall thickness enhancement clearly visible compared to that of control mouse.

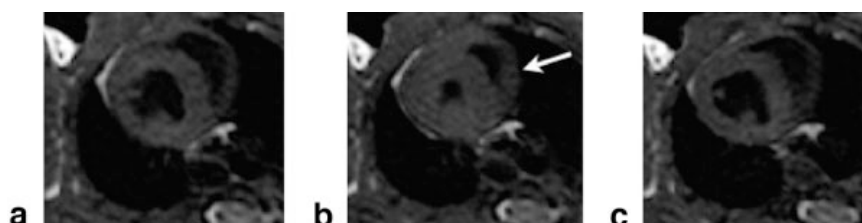


Table 2
Right Ventricle and Left Ventricle + Septum Volumes Measured With MRI (in μL) and Corresponding Wet Muscle Masses (in mg) of Excised Hearts From Normal and Hypoxic Mice

	MRI volume		Wet muscle mass	
	RV (μL)	LV+S (μL)	RV (mg)	LV+S (mg)
Normoxic mice ($n = 6$)	24 ± 3	113 ± 4	27.2 ± 1.5	105 ± 8
Chronic hypoxic ($n = 5$)	$31 \pm 3^*$	$91 \pm 4^*$	$47 \pm 2.5^*$	119 ± 7

* $P < 0.05$ (analysis of variance test).

flip angle), an obvious benefit for high-resolution imaging. Until now, the only two publications that document black-blood imaging of mouse heart at 4.7 T showed the use of an additional module for magnetization preparation (6,8). In those studies, blood signal appeared less suppressed and the spatial resolution was lower than in the present work. Thus, the TrueFISP sequence proposed here affords high image quality in reasonable scan times (<1 h).

TrueFISP imaging of mouse heart at high field needs retrospective ECG gating, whereas no respiratory gating was necessary (24). This avoids the need for time-consuming preparation and makes it possible to choose a posteriori the number of reconstructed images per cycle. The choice depends on the heart rate of each animal and on the required SNR. Increasing the number of reconstructed image per cycle would require either a high number of repeated acquisitions (more than 48) or an interpolation method to fulfill each k -space volume.

As previously described (20), it was not possible to homogenize the magnetic field in order to generate artifact-free TrueFISP images, particularly in the heart. Therefore, multiple acquisitions with sum-of-square reconstruction were performed, thereby allowing the reconstruction of artifact-free 4D images. Of course, the acquisition of four sets of images limited the minimum total acquisition time. At higher field strengths, at least eight sets of images would have to be acquired in order to correct the banding artifact. Consequently, an additional technique like parallel imaging or partial k -space acquisition would be required to circumvent too long suppressed an acquisition time, which would not be compatible with in vivo imaging.

Altogether, the quality of the images presented shows that the proposed method is appropriate for 4D mouse heart imaging, particularly in terms of spatial resolution and blood signal suppression. Images are obtained in less than 1 h of scan time, a duration that can easily be reduced with an acceptable loss in spatial resolution.

This new technique, which efficiency has been demonstrated on control mice, also makes it possible to estimate cardiac anatomic modifications developed in mice exposed to 4-week chronic hypoxia. Indeed, pulmonary hypertension-induced right ventricular hypertrophy, which was previously documented in the literature by an increase in the right ventricle-to-heart mass ratio, can now be visually evaluated in mice and quantified with volume analysis segmentation. Even the slight reduction in left ventricular volume induced by right ventricular hypertrophy, with regard to the interdependence of the left and

right ventricles in health and disease (25), can be evidenced in mouse heart. This technique therefore seems particularly adapted to describing more precisely the anatomic and functional changes occurring in numerous animal models of cardiac disease or during therapies.

The method can be easily implemented on standard MRI systems operating at 1.5 T or 3 T. The value of the method for the assessment of cardiac contractility in humans remains to be evaluated.

ACKNOWLEDGMENTS

Grant sponsors: Region Aquitaine, CNRS.

APPENDIX

$$M_{xy_GEerst} = M_0 \sin \alpha_{opt} \frac{1 - \exp(-TR/T_1)}{1 - \exp^2(-TR/T_1)}$$

with

$$\cos \alpha_{opt} = \exp(-TR/T_1)$$

$$M_{xy_TrueFISP}$$

$$= M_0 \frac{1 - \exp(-TR/T_1) \sin \alpha}{1 - \exp(-TR/T_1) \cos \alpha - \exp(-TR/T_2) (\exp(-TR/T_1) - \cos \alpha)}$$

REFERENCES

1. Ruff J, Wiesmann F, Hiller KH, Voll S, von Kienlin M, Bauer WR, Rommel E, Neubauer S, Haase A. Magnetic resonance microimaging for noninvasive quantification of myocardial function and mass in the mouse. *Magn Reson Med* 1998;40:43–48.
2. Slawson SE, Roman BB, Williams DS, Koretsky AP. Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart. *Magn Reson Med* 1998;39:980–987.
3. Wiesmann F, Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S. Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H652–H657.
4. Wiesmann F, Ruff J, Engelhardt S, Hein L, Dienesch C, Leupold A, Illinger R, Frydrychowicz A, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Lohse MJ, Neubauer S. Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice: acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts. *Circ Res* 2001;30:88:563–569.
5. Bishop J, Feintuch A, Bock NA, Nieman B, Dazai J, Davidson L, Henkelman RM. Retrospective gating for mouse cardiac MRI. *Magn Reson Med* 2006;55:472–477.

6. Feintuch A, Zhu Y, Bishop J, Davidson L, Dazai J, Bruneau BG, Henkelman RM. 4D cardiac MRI in the mouse. *NMR Biomed* 2007;20:360–365.
7. Bucholz E, Ghaghada K, Qi Y, Mukundan S, Johnson GA. Four-dimensional MR microscopy of the mouse heart using radial acquisition and liposomal gadolinium contrast agent. *Magn Reson Med* 2008;60:111–118.
8. Berr SS, Roy RJ, French BA, Yang Z, Gilson W, Kramer CM, Epstein FH. Black blood gradient echo cine magnetic resonance imaging of the mouse heart. *Magn Reson Med* 2005;53:1074–1079.
9. Edelman RR, Chien D, Kim D. Fast selective black blood MR imaging. *Radiology* 1991;181:655–660.
10. Mugler JP 3rd, Brookeman JR. The design of pulse sequences employing spatial presaturation for the suppression of flow artifacts. *Magn Reson Med* 1992;23:201–214.
11. Simonetti OP, Finn JP, White RD, Laub G, Henry DA. Black blood T2-weighted inversion-recovery MR imaging of the heart. *Radiology* 1996;199:49–57.
12. Croisille P, Guttman MA, Atalar E, McVeigh ER, Zerhouni EA. Precision of myocardial contour estimation from tagged MR images with a “black-blood” technique. *Acad Radiol* 1998;5:93–100.
13. Sirol M, Itskovich VV, Mani V, Aguinaldo JG, Fallon JT, Misselwitz B, Weinmann HJ, Fuster V, Toussaint JF, Fayad ZA. Lipid-rich atherosclerotic plaques detected by gadofluorine-enhanced in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2004;109:2890–2896.
14. Oppelt A, Graumann R, Barfu H, Fischer H, Hartl W, Schajor W. FISP: a new fast MRI sequence. *Electromedica* 1986;54:15–18.
15. Wieben O, Francois C, Reeder SB. Cardiac MRI of ischemic heart disease at 3 T: potential and challenges [review]. *Eur J Radiol* 2008;65:15–28.
16. Jahnke C, Paetsch I, Gebker R, Bornstedt A, Fleck E, Nagel E. Accelerated 4D dobutamine stress MR imaging with k-t BLAST: feasibility and diagnostic performance. *Radiology* 2006;241:718–728.
17. Rettmann DW, Saranathan M, Wu KC, Azevedo CF, Bluemke DA, Foo TK. High temporal resolution breathheld 3D FIESTA CINE imaging: validation of ventricular function in patients with chronic myocardial infarction. *J Magn Reson Imaging* 2007;25:1141–1146.
18. Greil GF, Germann S, Kozerke S, Baltes C, Tsao J, Urschitz MS, Seeger A, Tangcharoen T, Bialkowsky A, Miller S, Sieverding L. Assessment of left ventricular volumes and mass with fast 3D cine steady-state free precession k-t space broad-use linear acquisition speed-up technique (k-t BLAST). *J Magn Reson Imaging* 2008;27:510–515.
19. Bangerter NK, Hargreaves BA, Vasanawala SS, Pauly JM, Gold GE, Nishimura DG. Analysis of multiple-acquisition SSFP. *Magn Reson Med* 2004;51:1038–1047.
20. Miraux S, Massot P, Ribot EJ, Franconi JM, Thiaudiere E. 3D TrueFISP imaging of mouse brain at 4.7T and 9.4T. *J Magn Reson Imaging* 2008;28:497–503.
21. Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Thiaudiere E, Muller B, Diolez P. Modular control analysis (MoCA) of the effects of chronic hypoxia on mouse heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1891–R1897.
22. Gilson WD, Yang Z, French BA, Epstein FH. Measurement of myocardial mechanics in mice before and after infarction using multislice displacement-encoded MRI with 3D motion encoding. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1491–H1497.
23. Kober F, Iltis I, Cozzone PJ, Bernard M. Myocardial blood flow mapping in mice using high-resolution spin labeling magnetic resonance imaging: influence of ketamine/xylazine and isoflurane anesthesia. *Magn Reson Med* 2005;53:601–606.
24. Ruff J, Wiesmann F, Lanz T, Haase A. Magnetic resonance imaging of coronary arteries and heart valves in a living mouse: techniques and preliminary results. *J Magn Reson* 2000;146:290–296.
25. Clyne CA, Alpert JS, Benotti JR. Interdependence of the left and right ventricles in health and disease [review]. *Am Heart J* 1989;117:1366–1373.

APPLICATION DE MoCA SUR LES COEURS HYPOXIQUES

2

2.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Notre équipe a déjà développé et appliqué l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA) sur un modèle de coeur de rat afin de permettre une meilleure compréhension des effets complexes du calcium sur la bioénergétique cardiaque (Diolez et al. 2002; 2007). La validation de MoCA sur un modèle de souris représente une étape importante pour le développement de l'approche, étant donné le grand nombre de modèles murins de pathologies cardiaques disponibles (souris transgéniques, ...). Dans ce travail, nous présentons la première application de l'Analyse Modulaire du Contrôle sur coeur isolé perfusé de souris et pour l'étude d'une situation pathologique.

MoCA a été appliquée non seulement sur des coeurs de souris contrôles mais également sur le modèle de coeur hypoxique précédemment caractérisé dans notre première étude (Miroux et al. 2009). Ceci nous a permis de mettre en évidence les modifications intégrées de l'énergétique cardiaque induites par une exposition chronique à des conditions d'hypoxie.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans la revue *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* :

"MODULAR CONTROL ANALYSIS OF EFFECTS OF CHRONIC HYPOXIA ON MOUSE HEART"

Guillaume Calmettes, Véronique Deschodt-Arsac, Éric Thiaudière,
Bernard Muller et Philippe Diolez

American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.
2008 Dec ;295(6) :R1891-7

2.2 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

Dans cette étude, l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA) a été appliquée sur des coeurs perfusés afin de décrire les modifications de la régulation de l'énergétique cardiaque dévelop-

pées chez des souris soumises à une hypoxie chronique de 3 semaines. MoCA combine les outils de la spectroscopie RMN du ^{31}P et de l'Analyse du Contrôle Métabolique (Top Down) et permet de décrire la régulation intégrée du métabolisme énergétique dans des coeurs battants, en réduisant la complexité du système à deux modules (Producteur et Consommateur d'ATP-PCr) connectés par les intermédiaires énergétiques. Contrairement à nos premiers résultats obtenus sur coeur de rat, qui montraient que la contraction était entièrement contrôlée par la demande en énergie, l'énergétique des coeurs de souris est caractérisée par un contrôle partagé entre les modules Producteur et Consommateur d'ATP-PCr sur la contraction. Chez les souris hypoxiques, de manière surprenante, la diminution de l'activité contractile cardiaque et du rapport PCr/ATP est associée à une plus grande réponse (élasticité) des processus producteurs d'ATP-PCr suite à un changement de [PCr], par comparaison aux contrôles (-10.4 vs -2.46). Par contre, aucune modification n'a été détectée sur le module Consommateur d'ATP-PCr et des élasticités comparables ont été mesurées dans les deux populations de souris. Étant donné que les élasticités déterminent la régulation interne de l'énergétique de la contraction cardiaque, ces résultats montrent que l'étude de ce paramètre pertinent permet de déterminer l'origine des dysfonctions de l'énergétique cardiaque observées après exposition à des conditions d'hypoxie chronique. De plus, en considérant la diminution de la masse mitochondriale rapportée dans la littérature après exposition à l'hypoxie chronique, l'augmentation de la réponse des processus producteurs d'ATP-PCr à une augmentation de la demande en énergie pourrait refléter un mécanisme d'adaptation positive. Il apparait maintenant crucial de comprendre les processus moléculaires à l'origine de l'élasticité des processus producteurs d'ATP-PCr pour les intermédiaires énergétiques, ainsi que leur régulation.

2.3 ARTICLE 2

Cet article correspond à la référence ([Calmettes et al. 2008](#)).

Modular control analysis of effects of chronic hypoxia on mouse heart

Guillaume Calmettes,¹ Véronique Deschodt-Arsac,¹ Eric Thiaudière,¹ Bernard Muller,²
 and Philippe Diolez¹

¹Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536, Centre National de la Recherche Scientifique and ²Laboratoire de Pharmacologie de l'UFR Pharmacie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U885, Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

Submitted 30 June 2008; accepted in final form 26 September 2008

Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Thiaudière E, Muller B, Diolez P. Modular control analysis of effects of chronic hypoxia on mouse heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1891–R1897, 2008. First published October 1, 2008; doi:10.1152/ajpregu.90548.2008.—Modular control analysis (MoCA; Diolez P, Deschodt-Arsac V, Raffard G, Simon C, Santos PD, Thiaudière E, Arsac L, Franconi JM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R13–R19, 2007) was applied here on perfused hearts to describe the modifications of the regulation of heart energetics induced in mice exposed to 3-wk chronic hypoxia. MoCA combines ³¹P-NMR spectroscopy and modular (top down) control analysis to describe the integrative regulation of energy metabolism in the intact beating heart, on the basis of two modules [ATP/phosphocreatine (PCr) production and ATP/PCr consumption] connected by the energetic intermediates. In contrast with previous results in rat heart, in which all control of contraction was on ATP demand, mouse heart energetics presented a shared control of contraction between ATP/PCr-producing and -consuming modules. In chronic hypoxic mice, the decrease in heart contractile activity and PCr-to-ATP ratio was surprisingly associated with an important and significant higher response of ATP/PCr production (elasticity) to PCr changes compared with control hearts (−10.4 vs. −2.46). By contrast, no changes were observed in ATP/PCr consumption since comparable elasticities were observed. Since elasticities determine the regulation of energetics of heart contraction, the present results show that this new parameter may be used to uncover the origin of the observed dysfunctions under chronic hypoxia conditions. Considering the decrease in mitochondrial content reported after exposure to chronic hypoxia, it appears that the improvement of ATP/PCr production response to ATP demand may be viewed as a positive adaptive mechanism. It now appears crucial to understand the very processes responsible for ATP/PCr producer elasticity toward the energetic intermediates, as well as their regulation.

perfused mouse heart; systems biology; ³¹P-labeled magnetic resonance spectroscopy

CHRONIC HYPOXIA (CH) induces numerous adaptive changes in heart physiology, including remodeling. Indeed, in addition to the effect of lowered oxygen availability on oxidative cardiac metabolism, the heart is submitted to an increased workload as a result of the hypoxia-induced pulmonary hypertension (21, 22). This pathological situation induces complex structural, hormonal, and biochemical modifications that affect both energy-producing and energy-consuming processes in heart cells (see Refs. 20, 33). Concerning energy-producing modifications, an important reduction in the mitochondrial mass has been observed, associated with the reduction of the activities of respiratory chain complexes (29). In parallel, several studies

reported a metabolic switch from fatty acid to carbohydrate utilization after CH (13, 25, 28, 36, 37). In regard to energy-consuming processes, one of the early mechanisms observed in isolated mammalian cardiomyocytes submitted to acute hypoxia is a downregulation of protein and RNA synthesis (9, 34). Moreover, biochemical investigations under CH also revealed a modification of the contractile apparatus itself, characterized by an increase in β -myosin heavy chain expression in both ventricles (35). These modifications of ATP/phosphocreatine (PCr) production and consumption processes are concomitant with the alteration of the phosphorylated metabolite content of the heart during CH, mainly a PCr decrease (23, 30, 31), indicative of heart energetics failure (19). Calcium ion (Ca^{2+}) plays a crucial role in excitation-contraction coupling, and in vitro studies (2–4) as well as our more recent in situ study (17) have evidenced that Ca^{2+} also directly activates mitochondrial oxidative phosphorylation. In CH, an alteration of calcium homeostasis associated with a decrease in calcium transients and resulting heart contractility has been reported (9, 34).

In the present study we applied our new modular control analysis (MoCA), an integrative approach to intact beating heart energetics (16, 17), to better understand the overall effect as well as the relative importance of these various modifications induced by CH on the regulation of energetics in hearts from mice submitted to hypobaric hypoxic conditions. Indeed, an appealing aspect of modular network analysis is the feature of “emergence,” in which unexpected new properties arise from the cooperative interactions (integration) between biological processes (see Ref. 41 for review). The cardiovascular and muscular biochemical network has an intuitively modular structure (41); therefore, by associating noninvasive ³¹P-magnetic resonance spectroscopy (MRS) with the analytic tools of metabolic control analysis (5, 8), we have developed an experimental integrative approach to in situ cardiac (16, 17) and skeletal (1) muscle energetics. In situ MoCA gives quantitative information on the internal control and regulation of integrated organ function and represents a powerful way to investigate pathological or drug effects. In MoCA, heart energetics is described as an ATP/PCr producer and ATP/PCr consumer system connected by the pool of the energetic intermediates [free energy of ATP hydrolysis (ΔG_p), PCr, ATP, ADP, P_i]. A description of internal regulation and control of heart contraction under specific conditions is obtained after experimental determination of the kinetic properties (elasticity coefficients) of both supply (ATP/PCr producer) and demand (ATP/PCr consumer) modules toward the intermediates. In contraction

Address for reprint requests and other correspondence: P. Diolez, Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR5536 CNRS-Université Victor Segalen Bordeaux 2, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France (e-mail: diolez@rmsb.u-bordeaux2.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

processes, the rapid shuttling of PCr allows the regeneration of ATP, maintaining low ADP concentration and maximizing ΔG_p . Consequently, ATP (and ΔG_p) may be considered as the local currency, while PCr is the major global intermediate (41). Determined in the intact beating heart, the elasticity coefficients toward the global intermediate PCr quantify the sensitivity of each module to the energetic intermediates and can therefore be used to detect any significant modification in the enzymatic processes of the module. MoCA has been used recently to demonstrate the parallel activation of both ATP/PCr producer and consumer by Ca^{2+} acting as an external effector (17) and during activation of perfused heart contraction by epinephrine (27). The application of MoCA on isolated, perfused hearts from mice subjected to a chronic hypoxic environment was carried out in order to highlight which of the above changes induced by CH really affect the very mechanisms of contractile function.

In the present study, MoCA analysis revealed that control of heart contraction energetics in mouse heart is clearly different from that in rat heart. Indeed, whereas control resides almost entirely in the energy consumer in rats, we observed a distribution among ATP/PCr-producing and ATP/PCr-consuming processes in mice. By comparison with control mice, MoCA analysis of CH mice evidenced an increase in the sensitivity of energy supply toward the intermediates after CH acclimatization, i.e., better response to ATP demand. This result is surprising if we consider the severe mitochondrial alteration already reported (29). By contrast, no change in energy demand sensitivity was noted in this study, indicating that the integrated consumer module response is hardly affected by CH. The consequence for the integrative cardiac energetics is an unexpected decrease in the control by energy supply, which may represent a compensation mechanism for the decrease in mitochondrial activity.

MATERIALS AND METHODS

Chronic hypoxia. Female Swiss mice (aged 6 wk, weighing 18–23 g) were separated into two groups. One group (CH mice) was exposed to a simulated altitude of 5,000 m (barometric pressure 380 mmHg) in a well-ventilated, temperature-controlled hypobaric chamber for 21 days. The chamber was opened briefly three times a week for cleaning of the cages and feeding of the animals. The other control group (normoxic mice, control) was maintained under ambient normoxic conditions [inspired O_2 fraction (F_{I,O_2}) = 21%], with the same 12:12-h light-dark cycles. Free access to a standard mouse diet and water was allowed throughout the exposure period. The investigation conforms to the National and European Research Council Guide for the care and use of laboratory animals. P. Dirolez has been attributed a permanent license to conduct experiments on animals by the Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale of the Ministère de l'Agriculture et de la Forêt (03/17/1999).

Heart perfusion. Animals were killed by cervical dislocation, and the heart was quickly excised and immediately submerged in ice-cold physiological solution. The aorta was cannulated, and hearts were perfused in a non-recirculating servo pump system (EMKA Technologies, Paris, France) at constant pressure (100 mmHg) with a Krebs-Henseleit buffer containing (in mmol/l) 108 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 $MgSO_4$, 25 $NaHCO_3$, 0.5 EDTA, 1.1 mannitol, 11 glucose, 10 pyruvate, and 2.5 $CaCl_2$, pH 7.35. The perfusion was oxygenated with a 95% O_2 -5% CO_2 mixture and a hollow-fiber membrane oxygenator (100 HG Fiber Dialyzer, GAMBRO).

A stab wound was made in the apex of the left ventricle to allow drainage of any fluid that might accumulate in the ventricular cavity

(drain excess volume arising from Thebesian or arterioluminal sources). A fluid-filled latex balloon was inserted into the left ventricle via the left atrium for measurement of the left ventricular developed pressure and was connected to a P23 DB Gould-Statham pressure transducer through a fluid-filled polyethylene catheter.

Perfusion pressure, coronary flow, heart rate, and left ventricular developed pressure were measured continuously. Signals were recorded with dedicated software (IOX, EMKA Technologies). Mechanical performance of the heart was evaluated as the product of heart rate by developed pressure [rate-pressure product (RPP), in mmHg/min].

Each heart was placed inside a 10-mm NMR tube and transferred into a heated (37°C) 10-mm probe inside a 9.4-T superconducting magnet spectrometer (Bruker DPX 400-MHz Avance) for ^{31}P -NMR spectroscopy. All measurements were performed after a 20-min stabilization period.

NMR measurements. Pulsed Fourier-transformed ^{31}P -NMR spectra were obtained with a 9.4-T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany) with a 9-cm bore. The hearts were inserted into a $^1H/^{31}P$ double-tuned 10-mm probe. The probe was tuned to the phosphorus resonance frequency of 161.94 MHz, and the magnetic field homogeneity was optimized by shimming on the proton signal coming from the heart and the surrounding medium. Partially saturated ^{31}P -NMR spectra (14.5- μs radio frequency pulse, 60° flip angle, 2.18-s repetition time, 4,096 data points, reception bandwidth 5,196 Hz, 150 acquisitions, 10-Hz Lorentzian filter before Fourier transformation) were obtained without proton decoupling and were acquired within 4 min 59 s. Resonance areas were corrected after determination of T1 relaxation times of each phosphorus metabolite on perfused mouse hearts under the same experimental conditions.

Spectra were then analyzed with Igor Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) as a sum of Lorentzian-Gaussian line-shaped resonances to determine the areas of the nucleoside triphosphate (ATP) and PCr resonances. The β -ATP resonance area was fixed at 11.8 mmol/l (18) for the first spectra and used for the internal calibration of PCr in the NMR spectra. The PCr-to-ATP ratio was calculated as the PCr-to- β -ATP resonance area ratio.

Modular control analysis. The principles of MoCA have been extensively described elsewhere (17), and only a short description will be found here. In MoCA, complex systems may be simplified by grouping reactions and reactants into large modules connected by a small number of explicit intermediates (6). We applied this to the study of energy transfer during contraction in heart by defining two modules (called producer and consumer) linked by energetic intermediates. In the working heart, because ATP concentration did not change under physiological conditions of heart activity, PCr was chosen as the representative intermediate between energy production and consumption. The producer module is then defined as all the steps from substrate and oxygen supply to ATP and PCr production (16, 17). The consumer module comprises all the ATP-consuming processes occurring during contraction (myosin ATPases and calcium reuptake by sarcoplasmic reticulum and cell membrane) (16, 17). Continuous noninvasive ^{31}P -NMR spectroscopy of perfused heart gives access to all energetic intermediates, including the representative intermediate, PCr. The energetic flux through the system was simultaneously assessed as the contractile activity measured by RPP (see above).

Following the principles of MoCA, control coefficients over the energy flux in heart contraction were calculated from the overall elasticities of the producer and consumer modules toward the intermediate (5). In MoCA, these elasticities (ϵ_{PCr}^{Module}) are calculated from the changes in flux (RPP) and PCr concentration ([PCr]) under steady-state conditions induced by a slight modulation of the activity of the other module (see Refs. 16, 17 for details). Experimentally, three different contraction steady states must be obtained in order to calculate elasticity coefficients, corresponding to

the reference state flanked by the two specific modulations of the modules (see Fig. 1). After heart stabilization, changes in [PCr] were induced by increasing internal balloon volume in order to trigger increased heart contraction (RPP) (4) and to calculate producer elasticity (ϵ_{PCr}^P). Because of the interdependence of the left and right ventricles (12) the volume of the left ventricle was reduced after CH, because of right ventricle hypertrophy. Therefore, balloon volume was increased from 7.5 μ l to 15 μ l in CH mice and from 10 μ l to 20 μ l in control mice. The steady states obtained after balloon pressure increase were deduced from the optima of the volume-pressure curves (results not shown) and considered as the reference state for the experimental determination of both elasticities. The second modulation concerned the producer module in order to determine consumer module elasticity (ϵ_{PCr}^C). For this purpose, a low cyanide concentration (0.3 mM NaCN) combined with 75 μ M iodoacetic acid (IAA) was used to slightly inhibit mitochondrial cytochrome oxidase and totally (>95%) inhibit glycolysis at the level of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (11), respectively. ϵ_{PCr}^C was calculated from the relative changes in contractile activity (RPP) and [PCr], in the ratio between the reference state and the new state of "low supply" reached.

The control coefficients of both modules (C_P^{Flux} and C_C^{Flux}) were then calculated from experimentally measured ϵ_{PCr}^C and ϵ_{PCr}^P according to summation and connectivity theorems (26). These experiments and subsequent calculations allow the complete description of the control pattern of the energetics of heart contraction under the conditions studied.

Statistical analysis. Experimental values are reported as means \pm SD for the numbers of independent mouse hearts indicated. Statistical comparison between groups (hypobaric vs. control) was performed by one-way analysis of variance and post hoc Tukey honestly significant difference (HSD) tests. $P < 0.05$ and $P < 0.01$ stand for significant difference levels.

RESULTS

Effects of chronic hypoxia on morphometrics and cardiac contractile function. Heart weight was significantly increased after 3-wk exposure to CH (Table 1, $P < 0.01$). As already reported, body weight was significantly lower in CH mice (Table 1), attributable to the decrease in food intake observed during exposure to CH (14). Therefore, when expressed relative to body weight, total heart mass was increased by 33% at the end of CH exposure.

An example of the measurements obtained during MoCA-designed experiments is presented in Fig. 1. RPP and 31 P-MRS spectra were measured simultaneously during the specific modulations of the steady-state perfused heart contraction. Figure 1 shows the three successive steady states (see below and MATERIALS AND METHODS for details): inhibition of contraction (low balloon volume; *state a*), reference state (optimal balloon volume; *state b*), and inhibition of ATP/PCr production (*state c*). In this typical experiment, it can be seen that CH mice hearts were mainly characterized by a lower RPP. Table 2 describes the differences between control and CH hearts under reference-state conditions in regard to all of the measured parameters. While heart rate was not affected in CH, the left ventricular developed intraventricular pressure was significantly lower for CH (-50%) compared with control hearts (Table 2). The decrease in developed pressure induced a 56% significant decrease in heart work as reflected by RPP. The values of metabolite contents determined by NMR spectroscopy of the perfused hearts showed a significant 10% decrease in PCr-to-ATP ratio in CH hearts (Table 2, $P < 0.01$). These results may be related to the classical energetic failure observed in hypoxia (19, 32, 40).

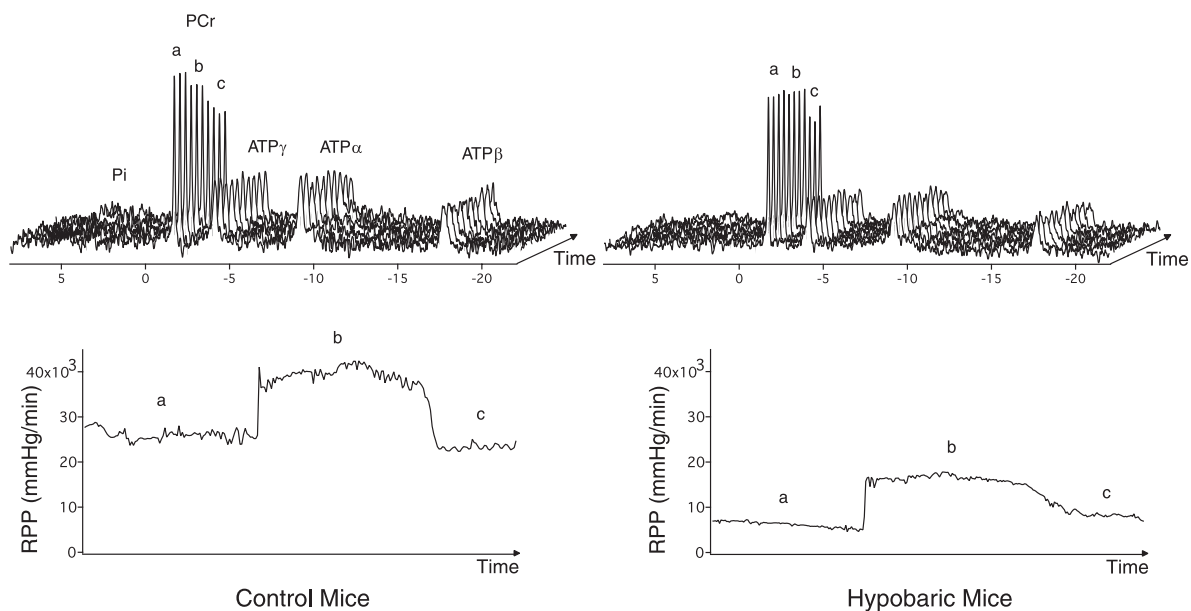


Fig. 1. Typical phosphocreatine (PCr) and rate-pressure product (RPP) records from control and hypobaric mice carried out to calculate producer and consumer elasticities in a single isolated, perfused heart. RPP and 31 P magnetic resonance spectroscopy (MRS) spectra were measured simultaneously during modulation of the steady state. MRS spectra were analyzed to assess steady values of energetic intermediates. The magnitude of the RPP was averaged over the corresponding period of time. *a*, Inhibition of contraction (low balloon volume); *b*, reference state (optimal balloon volume); *c*, inhibition of ATP/PCr production [NaCN + iodoacetic acid (IAA)].

R1894

MOCA ANALYSIS OF HYPOXIC MICE HEART

Table 1. Effect of hypobaric hypoxia on body and heart mass

Morphometrics	Control Mice (n = 29)	Hypobaric Mice (n = 25)
Body weight, g	30.74 ± 1.70	28.61 ± 2.08*
Heart weight, mg	136 ± 23	167 ± 14†
Heart weight/body weight (×1,000)	4.42 ± 0.75	5.87 ± 0.48†

Values are means ± SE. Differences were tested by 1-way analysis of variance and post hoc Tukey honestly significant difference (HSD) tests. **P* < 0.05, †*P* < 0.01 between control and hypobaric mice.

MoCA analysis. The first step in the analysis is the determination in intact heart of the kinetic interactions (elasticities) of the two modules (ATP/PCr producer and consumer) with [PCr] (17). With this aim, a specific modulation of one module is carried out in order to induce a change in [PCr] and measure the effect on the activity of the other module (RPP). To determine the producer response to PCr changes, myofilament Ca²⁺ sensitivity was enhanced dynamically by stretching the myofilaments slightly (Frank-Starling effect), through a balloon inserted into the ventricle. In this study, the experiment was started under low-pressure conditions, and the balloon was further inflated to reach the optimum contractile activity of the heart as the reference steady state (Fig. 1; see MATERIALS AND METHODS for details). This increase in balloon pressure induced a small decrease in [PCr] associated with an increase in heart contractile activity (RPP), reflecting the response of the producer module to the induced change in PCr (Fig. 1). As to the producer, since any mitochondrial inhibitor will do, cyanide (at very low concentration, 0.3 mM) was chosen for this study to determine consumer elasticity to PCr. An important difference from perfused rat heart (17) is the utilization of both glucose and pyruvate as substrates for perfused mouse heart (24); therefore the mild mitochondrial inhibition was combined with a severe inhibition of glycolysis by IAA. Inhibition of the ATP/PCr producer induced a decrease in PCr and a concomitant decrease in RPP (Fig. 1), in both CH and control mice. Table 3 presents RPP and PCr content values for the two groups under the reference steady state, as well as the relative changes observed during each specific modulation. These re-

Table 2. Effect of hypobaric hypoxia on cardiac contractile function and metabolite content

	Control Mice (n = 29)	Hypobaric Mice (n = 25)
<i>LV cardiac parameters</i>		
Heart rate, beats/min	436 ± 47	416 ± 56
Developed pressure, mmHg	78 ± 36	39 ± 15†
RPP, mmHg/min	34,382 ± 19,008	15,175 ± 6,709†
<i>Metabolite content</i>		
[PCr], mM	13.62 ± 2.82	11.69 ± 1.88*
[ATP], mM	11.42 ± 1.34	10.93 ± 0.66
[PCr]/[ATP]	1.19 ± 0.16	1.07 ± 0.14*

Values are means ± SE. Heart rate and left ventricle (LV) developed pressure were measured with a fluid-filled balloon inserted into the LV. Metabolic contents of the myocardium from hypoxic and control mice were measured by ³¹P-NMR. [PCr], [ATP], phosphocreatine and ATP concentrations; RPP, rate-pressure product. Differences were tested by 1-way analysis of variance and post hoc Tukey HSD tests. **P* < 0.05, †*P* < 0.01 between control and hypobaric mice.

Table 3. Relative changes in PCr and in contractile activity (RPP) from reference steady state induced by small change in intraventricular pressure or by mild mitochondrial inhibition by cyanide

	Control Mice	Hypobaric Mice
Reference steady state		
[PCr], mM	13.62 ± 2.82	11.69 ± 1.88*
RPP, mmHg/min	34,382 ± 19,008	15,175 ± 6,709†
Change in intraventricular pressure		
PCr (Δ[PCr]/[PCr] _i)	-14.7 ± 6.1	-5.9 ± 2.1†
RPP (ΔRPP/RPP _i)	+27.2 ± 8.9	+43.3 ± 12.2†
Cyanide + IAA inhibition		
PCr (Δ[PCr]/[PCr] _i)	-28.2 ± 14.4	-23.7 ± 7.0
RPP (ΔRPP/RPP _i)	-40.4 ± 8.8	-44.4 ± 12.1

Values are means ± SE. RPP_i, initial RPP; [PCr]_i, initial [PCr]; IAA, iodoacetic acid. Differences were tested by 1-way analysis of variance and post hoc Tukey HSD tests. **P* < 0.05, †*P* < 0.01 between control and hypobaric mice.

sults represent the necessary set of data required for compared MoCA analysis of CH and control perfused hearts. The main differences were observed after increasing intraventricular pressure (consumer activation). CH hearts presented a much higher response of producer (+43.3% increase in RPP) compared with control hearts (+27.2%). Surprisingly, this higher increase in RPP was associated with a smaller decrease in [PCr] (-6% vs. -15%). By contrast, the producer inhibition by cyanide and IAA was responsible for about the same effect in both CH and control hearts for PCr as well as RPP (-25% change in [PCr] for a -40% decrease in energy flux) (Table 3).

The above relative changes in RPP and [PCr] were used to calculate the elasticity coefficients of the producer and consumer modules reported in Fig. 2 as well as the contraction control coefficients presented in Table 4, which represent the control exerted by each module (producer and consumer) on the overall contractile activity. In control hearts, the absolute

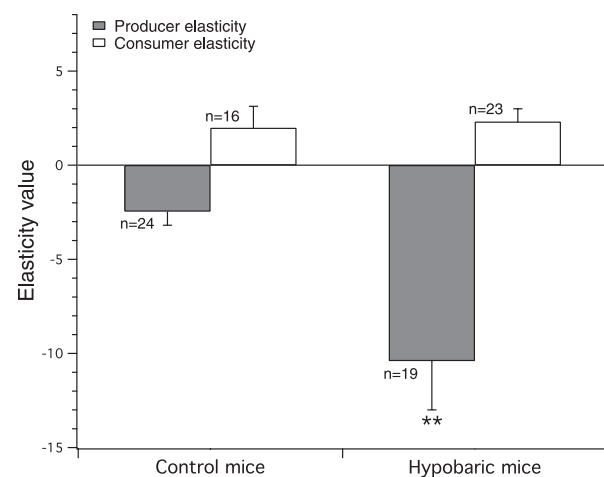


Fig. 2. Elasticity of producer and consumer modules in control and hypoxic hearts. Filled bars, producer elasticity for control (-2.46 ± 0.73) and hypobaric (-10.40 ± 2.60) mice; open bars, consumer elasticity for control (1.98 ± 1.15) and hypobaric (2.31 ± 0.69) mice. Data are presented as means ± SE. Differences were tested by 1-way analysis of variance and post hoc Tukey honestly significant difference tests. ***P* < 0.01 between control and hypobaric mice.

Table 4. Control coefficients of producer and consumer modules in control and hypoxic hearts

	Control Coefficient Over Flux, %	
	Control Mice (<i>n</i> = 12)	Hypobaric Mice (<i>n</i> = 21)
Producer	46 ± 16	18 ± 7 ^{†‡}
Consumer	54 ± 16	82 ± 7 ^{†‡}

Values are means ± SE. Differences were tested by 1-way analysis of variance and post hoc Tukey HSD tests. [†]*P* < 0.01 between control and hypobaric mice; [‡]*P* < 0.01 between producer and consumer.

values of both elasticity coefficients were almost identical between producer and consumer (-2.46 ± 0.73 and 1.98 ± 1.15 , respectively). The direct consequence is that control of heart contraction is almost perfectly shared between producer and consumer (Table 4) in control perfused mouse heart. This conclusion is a striking difference with our previous results on perfused rat heart, in which control is almost entirely in the consumer in the presence of pyruvate or glucose as substrate (16, 17).

By comparison, we observed an important increase in producer elasticity to changes in PCr with CH hearts (-10.40 ± 2.60 for CH compared with -2.46 ± 0.73 for control; *P* < 0.01) but no significant change in consumer elasticity (2.31 ± 0.69 and 1.98 ± 1.15 for CH and control, respectively). The distribution of control of contraction in CH hearts calculated from these elasticities was not balanced and was about 20% for the producer and 80% for the consumer (Table 4). These results demonstrate that one important consequence of CH on heart function is a marked decrease in the control exerted by ATP/PCr producer on contraction energetics, which is due to a surprising increase in the producer's response (elasticity) to ATP demand by contracting myofibrils.

DISCUSSION

The kinetic interaction of ATP/PCr-producing and -consuming modules with PCr takes a central place in cardiac energetics (healthy and pathological) since it characterizes the transfer of information from ATP/PCr consumer (increase in contractility induced by Ca^{2+} transients) to ATP/PCr producer via the modification of [PCr]. Consequently, steady-state contraction characteristics strongly rely on these interactions, which are the elasticities of the different modules toward PCr, experimentally determined by MoCA in the present study.

The results obtained with CH mice presented here show a marked perturbation of heart contractile activity and especially in the steady-state concentrations of the energetic intermediates, since an important decrease in PCr-to-ATP ratio was observed in CH mice associated with a decrease in overall contractile activity by 56%. Indeed, the modification in phosphorus metabolite content is an index of cardiac diseases (19) and has been described in detail in chronic hypoxic hearts of several animal models (23, 30, 31). From our previous studies, the changes in the intermediates cannot be accounted for by the decrease in contractile activity, but uncover fundamental modifications in the mechanisms responsible for steady-state contraction energetics. This view is supported by previous findings that exposure of rats to CH triggers an alteration in mitochondrial respiratory chain complexes (29) and reduces both release and reuptake of Ca^{2+} by sarcoplasmic reticulum and therefore

Ca^{2+} transients (34, 39). Such an alteration in contractility has already been observed in other cardiac disease models, e.g., with spontaneously hypertensive rats (15). Together, all these data indicate the occurrence in CH hearts of a decrease in oxidative phosphorylation by two mechanisms: a decrease in mitochondrial activity (29) worsened by a lack of activation by a decrease in Ca^{2+} transients (17), which also decreases contractile activity directly (34, 39).

However, we also observed in the present study a surprising improvement of the contractile response to the increase in balloon pressure (Frank-Starling effect) after the 3-wk period of acclimation to CH. Indeed, in response to an even smaller increase in ventricular pressure (balloon volume), CH hearts displayed a significantly bigger response in RPP compared with control hearts, associated with a much smaller decrease in PCr (Fig. 1). Since careful experimentation on skinned cardiomyocytes has demonstrated the absence of modification of the Frank-Starling response after CH (10), it appeared difficult to explain this improved response to higher ATP demand by contraction, especially if we consider the above results showing a decrease in mitochondrial activity and activation in CH hearts.

Because of the complex interactions occurring in the heart and the apparent contradictory data presented here, an integrative approach appeared necessary in order to gain a comprehensive description of the very mechanisms responsible for the changes in contractility observed with CH hearts. In this study, we applied MoCA to study the changes in the elasticities of the ATP/PCr-producing and -consuming modules toward PCr in CH hearts. The main interesting feature when applied to the study of pathologies is the consideration that only the module presenting an overall modified elasticity by the pathology has significant impact on intact heart function.

First, the present study on the control mouse perfused heart showed equivalent elasticities of producer and consumer modules, and consequently an almost shared repartition of the control of contraction. This result was surprising in view of our previous results in rat heart, in which we showed that control was almost totally in the consumer (ATP demand, between 90% and 95%), because of a much higher elasticity of the producer toward PCr (17). While this important difference between mouse and rat hearts needs further investigation, a possible explanation could reside in the very high contractile activity of the mouse heart. Indeed, comparable RPPs were recorded with mouse and rat hearts under our conditions ($\sim 30,000$ – $40,000$ mmHg/min), while mouse heart is ~ 10 times smaller and has a much higher rate (400 compared with 250 beats/min for rat heart). We may therefore suggest that the elasticity of the ATP/PCr producer toward [PCr] could decrease at high cardiac contractile activity.

When applied to mice exposed for 3 wk to CH, MoCA revealed a surprising significant fourfold increase in the elasticity of the producer module to changes in PCr compared with control mice. In contrast, no modification in the elasticity of the ATP/PCr consumer was evidenced in this study. As discussed above, these results clearly show that the changes in the ATP/PCr producer module experimentally evidenced here are fully responsible for the observed changes in heart contraction energetics in CH perfused hearts. The most obvious process whose modification may be responsible for the change in the kinetic interaction between ATP/PCr producer and PCr is the adenylate translocator (ANT)-mitochondrial creatine kinase-

R1896

MOCA ANALYSIS OF HYPOXIC MICE HEART

porin complex (7), which is at the interface between mitochondria and the energetic intermediates, including creatine/PCr. It has been already shown that binding of creatine kinase with mitochondrial membranes can be modulated by different factors, particularly calcium (38). The surprising increase in the elasticity of the ATP/PCr producer observed here, despite a decrease in global activity, emphasizes a new property of the system and could be considered as an adaptative mechanism developed in the heart under CH counteracting the decrease in activity and activation, both linked to the decrease in calcium transients. Strongly suggested from the present results, the role of Ca^{2+} and PCr concentrations in the modulation of ATP/PCr producer elasticity in healthy and CH hearts, and therefore in the overall regulation of cardiac energetics, needs to be clarified.

It appears crucial to further investigate this fundamental property, which is a direct consequence of organ integration and can only be assessed through integrative approaches applied to intact organs. MoCA appears to be a very promising approach since the noninvasive use of ^{31}P -NMR allows the possible use in vivo.

Perspectives and Significance

The present work is the first application of our modular control analysis to heart pathology. MoCA is one of the new systems biology approaches currently being developed and allows the integrative and noninvasive study of the energetics of intact beating heart. The results presented in this paper clearly show that integrative approaches effectively bring a new type of information providing new insights into the complex internal regulations of integrated organ function. In the near future systems biology approaches may be crucial in the actual attempts to link molecular events to physiology and pathology.

GRANTS

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Victor Segalen (Bordeaux 2), Conseil Régional de la Région Aquitaine, and Institut Fédératif de Recherche (IFR)4, Bordeaux, France.

REFERENCES

- Arsac LM, Beuste C, Miraux S, Deschodt-Arsac V, Thiaudiere E, Franconi JM, Dioloz PH. In vivo modular control analysis of energy metabolism in contracting skeletal muscle. *Biochem J* 414: 391–397, 2008.
- Balaban RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1259–1271, 2002.
- Balaban RS, Bose S, French SA, Territo PR. Role of calcium in metabolic signaling between cardiac sarcoplasmic reticulum and mitochondria in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C285–C293, 2003.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198–205, 2002.
- Brand MD. Top down metabolic control analysis. *J Theor Biol* 182: 351–360, 1996.
- Brand MD, Curtis RK. Simplifying metabolic complexity. *Biochem Soc Trans* 30: 25–30, 2002.
- Brdiczka D, Beutner G, Ruck A, Dolder M, Wallimann T. The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors* 8: 235–242, 1998.
- Brown GC, Hafner RP, Brand MD. A “top-down” approach to the determination of control coefficients in metabolic control theory. *Eur J Biochem* 188: 321–325, 1990.
- Casey TM, Pakay JL, Guppy M, Arthur PG. Hypoxia causes down-regulation of protein and RNA synthesis in noncontracting mammalian cardiomyocytes. *Circ Res* 90: 777–783, 2002.
- Cazorla O, Ait Mou Y, Goret L, Vassort G, Dauzat M, Lacampagne A, Tanguy S, Obert P. Effects of high-altitude exercise training on contractile function of rat skinned cardiomyocyte. *Cardiovasc Res* 71: 652–660, 2006.
- Chatham J, Gilbert HF, Radda GK. Inhibition of glucose phosphorylation by fatty acids in the perfused rat heart. *FEBS Lett* 238: 445–449, 1988.
- Clyne CA, Alpert JS, Benotti JR. Interdependence of the left and right ventricles in health and disease. *Am Heart J* 117: 1366–1373, 1989.
- Daneshrad Z, Garcia-Riera MP, Verdys M, Rossi A. Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. *Mol Cell Biochem* 210: 159–166, 2000.
- Daneshrad Z, Novel-Chate V, Birot O, Serrurier B, Sanchez H, Bigard AX, Rossi A. Diet restriction plays an important role in the alterations of heart mitochondrial function following exposure of young rats to chronic hypoxia. *Pflügers Arch* 442: 12–18, 2001.
- Delbridge LM, Connell PJ, Morgan TO, Harris PJ. Contractile function of cardiomyocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 28: 723–733, 1996.
- Dioloz P, Raffard G, Simon C, Leducq N, Dos SP, Canioni P. Mitochondria do not control heart bioenergetics. *Mol Biol Rep* 29: 193–196, 2002.
- Dioloz P, Deschodt-Arsac V, Raffard G, Simon C, Santos PD, Thiaudiere E, Arsac L, Franconi JM. Modular regulation analysis of heart contraction: application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R13–R19, 2007.
- Dos Santos P, Aliev MK, Dioloz P, Duclos F, Besse P, Bonoron-Adele S, Sikk P, Canioni P, Saks VA. Metabolic control of contractile performance in isolated perfused rat heart. Analysis of experimental data by reaction:diffusion mathematical model. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1703–1734, 2000.
- Epstein FH. MR in mouse models of cardiac disease. *NMR Biomed* 20: 238–255, 2007.
- Essop MF. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* 584: 715–726, 2007.
- Falk JA, Kadiev S, Criner GJ, Scharf SM, Minai OA, Diaz P. Cardiac disease in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 5: 543–548, 2008.
- Han MK, McLaughlin VV, Criner GJ, Martinez FJ. Pulmonary diseases and the heart. *Circulation* 116: 2992–3005, 2007.
- Hochachka PW, Clark CM, Holden JE, Stanley C, Ugurbil K, Menon RS. ^{31}P magnetic resonance spectroscopy of the Sherpa heart: a phosphocreatine/adenosine triphosphate signature of metabolic defense against hypobaric hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1215–1220, 1996.
- Hoerter J, Gonzalez-Barroso MD, Couplan E, Mateo P, Gelly C, Cassard-Doulcier AM, Dioloz P, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* 110: 528–533, 2004.
- Holden JE, Stone CK, Clark CM, Brown WD, Nickles RJ, Stanley C, Hochachka PW. Enhanced cardiac metabolism of plasma glucose in high-altitude natives: adaptation against chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 79: 222–228, 1995.
- Kacser H, Burns JA. The control of flux. *Symp Soc Exp Biol* 27: 65–104, 1973.
- Korzeniewski B, Deschodt-Arsac V, Calmettes G, Franconi JM, Dioloz PH. Physiological heart activation by adrenaline involves parallel activation of ATP usage and supply. *Biochem J* 413: 343–347, 2008.
- Leverve X. Metabolic and nutritional consequences of chronic hypoxia. *Clin Nutr* 17: 241–251, 1998.
- Novette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, Sztark F. Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* 66: 132–140, 2005.
- Novel-Chate V, Aussedat J, Saks VA, Rossi A. Adaptation to chronic hypoxia alters cardiac metabolic response to beta stimulation: novel face

- of phosphocreatine overshoot phenomenon. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1679–1687, 1995.
31. **Novel-Chate V, Mateo P, Saks VA, Hoerter JA, Rossi A.** Chronic exposure of rats to hypoxic environment alters the mechanism of energy transfer in myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1295–1303, 1998.
 32. **Omerovic E, Basetti M, Bollano E, Bohlooly YM, Tornell J, Isgaard J, Hjalmarson A, Soussi B, Waagstein F.** In vivo metabolic imaging of cardiac bioenergetics in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 222–228, 2000.
 33. **Ostadal B, Kolar F.** Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol* 158: 224–236, 2007.
 34. **Pei JM, Kravtsov GM, Wu S, Das R, Fung ML, Wong TM.** Calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during chronic hypoxia: a time course study. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1420–C1428, 2003.
 35. **Pissarek M, Bigard X, Mateo P, Guezennec CY, Hoerter JA.** Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia: role of anorexia and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 272: H1690–H1695, 1997.
 36. **Razeghi P, Young ME, Abbasi S, Taegtmeyer H.** Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 5–10, 2001.
 37. **Rumsey WL, Abbott B, Bertelsen D, Mallamaci M, Hagan K, Nelson D, Erecinska M.** Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H71–H80, 1999.
 38. **Schlattner U, Dolder M, Wallimann T, Tokarska-Schlattner M.** Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* 276: 48027–48030, 2001.
 39. **Silverman HS, Wei S, Haigney MC, Ocampo CJ, Stern MD.** Myocyte adaptation to chronic hypoxia and development of tolerance to subsequent acute severe hypoxia. *Circ Res* 80: 699–707, 1997.
 40. **Ten Hove M, Neubauer S.** MR spectroscopy in heart failure—clinical and experimental findings. *Heart Fail Rev* 12: 48–57, 2007.
 41. **Weiss JN, Yang L, Qu Z.** Systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders: network perspectives of cardiovascular metabolism. *J Lipid Res* 47: 2355–2366, 2006.



INSENSIBILITÉ DES COEURS HYPOXIQUES À LA BAISSÉ D'OXYGÈNE

3.1 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Malgré les altérations globales de l'énergétique cardiaque développées pendant l'hypoxie chronique (Ostadal and Kolar 2007, Essop 2007), cette situation semble également mettre en jeu des mécanismes à l'origine d'une plus grande résistance de la fonction cardiaque aux conditions d'ischémie aigüe (Ostadal and Kolar 2007). Ainsi, les coeurs hypoxiques chroniques développent par exemple des tailles de nécroses réduites après une ischémie (Meerson et al. 1973), et sont caractérisés par une activité contractile beaucoup plus importante après reperfusion (Tajima et al. 1994), en comparaison avec des coeurs contrôles. De même, après hypoxie chronique, les coeurs développent moins d'arythmies lorsque la concentration en oxygène disponible pour le coeur est réduite (Asemu et al. 1999). Les mécanismes à l'origine de cette plus grande tolérance des coeurs à une limitation d'oxygène ne sont pas encore bien compris.

Dans notre précédente étude (Calmettes et al. 2008), l'application de MoCA pour l'étude des modifications intégrées induites par l'hypoxie chronique sur l'énergétique cardiaque a révélé une surprenante augmentation d'élasticité du module Producteur. Les mécanismes ainsi que la pertinence physiologique de cette modification (qui traduit une plus grande réponse des processus impliqués dans la production d'énergie à une augmentation de la demande énergétique), restent inconnus, mais pourraient jouer un rôle majeur dans la plus grande résistance des coeurs à une baisse d'oxygène après hypoxie chronique.

Dans cette étude, MoCA a été appliquée sur des coeurs contrôles et hypoxiques perfusés en conditions d'oxygène réduits, afin d'analyser l'avantage potentiel pour l'énergétique cardiaque, soumise à des conditions d'hypoxie aigüe, d'une plus grande élasticité du module Producteur. De plus, l'obtention des élasticités (et des coefficients de contrôle) des coeurs en condition d'hypoxie nous a permis d'appliquer une analyse de régulation des effets de la baisse d'oxygène sur l'énergétique cardiaque.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans la revue *PLOS One* :

"IMPROVED ENERGY SUPPLY REGULATION IN CHRONIC HYPOXIC MOUSE COUNTERACTS HYPOXIA-INDUCED ALTERED CARDIAC ENERGETICS"

Guillaume Calmettes, Véronique Deschodt-Arsac, Gilles Gouspillou, Sylvain Miraux, Bernard Muller, Jean-Michel Franconi, Éric Thiaudière et Philippe Diolez

PLOS One. 2010 Feb 18;5(2):e9306

3.2 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

CONTEXTE : *L'hypoxie est une condition associée aux principales pathologies cardiaques. De ce fait, la compréhension de la tolérance à l'hypoxie, développée après des adaptations physiologiques comme l'hypoxie chronique, est cruciale afin de mieux appréhender les effets délétères induits par l'hypoxie. Dans cette étude, nous avons étudié le rôle des modifications énergétiques induites par l'hypoxie chronique dans le développement d'une plus grande tolérance à la baisse d'oxygène.*

METHODOLOGIE / PRINCIPAUX RÉSULTATS : *Des souris SWISS ont été hébergées pendant 21 jours dans une chambre hypobare, simulant une altitude de 5500 m. Les coeurs isolés perfusés de ces souris ainsi que d'une population de souris témoins ont permis d'étudier les effets d'une diminution de la concentration d'oxygène dans le milieu de perfusion sur le travail cardiaque (PPF) et la concentration en phosphocréatine ([PCr], mesurée par spectroscopie RMN du ^{31}P). Ceci a été réalisé dans le but de décrire les modifications intégrées de l'énergétique cardiaque dans des conditions d'hypoxie aiguë, en appliquant l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA). L'hypoxie aiguë induit une baisse concomitante de la PPF (– 46 %) et de la [PCr] (– 23 %) chez les coeurs contrôles, en contraste avec l'énergétique des coeurs hypoxiques qui n'est pas affectée par la diminution d'oxygène. MoCA démontre que cette tolérance à l'hypoxie est la conséquence directe de la plus grande élasticité par rapport à la [PCr] des processus de production d'ATP des coeurs hypoxiques comparés aux coeurs contrôles (– 1.88 ± 0.38 vs – 0.89 ± 0.41 , $p < 0.01$) mesurée dans des conditions d'oxygénation réduite. Cette plus grande élasticité permet une plus grande réponse des processus producteurs d'énergie face à une augmentation de la demande en énergie. La conséquence est la conservation d'une répartition normale du contrôle sur la contraction dans les coeurs hypoxiques, alors que les coeurs contrôles deviennent majoritairement contrôlés par les processus producteurs d'énergie.*

CONCLUSION / PERTINENCE DES RESULTATS : *Comme suggéré par cette étude, les mécanismes responsables de l'augmentation de l'élasticité et donc de la plus grande capacité du métabolisme énergétique des coeurs hypoxiques à faire face à une diminution d'oxygène, pourraient participer à limiter les dommages causés par l'hypoxie.*

3.3 ARTICLE 3

Cet article correspond à la référence ([Calmettes et al. 2010](#)).

Improved Energy Supply Regulation in Chronic Hypoxic Mouse Counteracts Hypoxia-Induced Altered Cardiac Energetics

Guillaume Calmettes^{1*}, Véronique Deschodt-Arsac¹, Gilles Gouspillou¹, Sylvain Miraux¹, Bernard Muller², Jean-Michel Franconi¹, Eric Thiaudiere¹, Philippe Diolez^{1*}

¹ Laboratoire de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536 CNRS Université Bordeaux 2, Bordeaux, France, ² Laboratoire de Pharmacologie, INSERM U885, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France

Abstract

Background: Hypoxic states of the cardiovascular system are undoubtedly associated with the most frequent diseases of modern time. Therefore, understanding hypoxic resistance encountered after physiological adaptation such as chronic hypoxia, is crucial to better deal with hypoxic insult. In this study, we examine the role of energetic modifications induced by chronic hypoxia (CH) in the higher tolerance to oxygen deprivation.

Methodology/Principal Findings: Swiss mice were exposed to a simulated altitude of 5500 m in a barochamber for 21 days. Isolated perfused hearts were used to study the effects of a decreased oxygen concentration in the perfusate on contractile performance (RPP) and phosphocreatine (PCr) concentration (assessed by ³¹P-NMR), and to describe the integrated changes in cardiac energetics regulation by using Modular Control Analysis (MoCA). Oxygen reduction induced a concomitant decrease in RPP (−46%) and in [PCr] (−23%) in Control hearts while CH hearts energetics was unchanged. MoCA demonstrated that this adaptation to hypoxia is the direct consequence of the higher responsiveness (elasticity) of ATP production of CH hearts compared with Controls (−1.88±0.38 vs −0.89±0.41, p<0.01) measured under low oxygen perfusion. This higher elasticity induces an improved response of energy supply to cellular energy demand. The result is the conservation of a healthy control pattern of contraction in CH hearts, whereas Control hearts are severely controlled by energy supply.

Conclusions/Significance: As suggested by the present study, the mechanisms responsible for this increase in elasticity and the consequent improved ability of CH heart metabolism to respond to oxygen deprivation could participate to limit the damages induced by hypoxia.

Citation: Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Gouspillou G, Miraux S, Muller B, et al. (2010) Improved Energy Supply Regulation in Chronic Hypoxic Mouse Counteracts Hypoxia-Induced Altered Cardiac Energetics. PLoS ONE 5(2): e9306. doi:10.1371/journal.pone.0009306

Editor: Arnold Schwartz, University of Cincinnati, United States of America

Received: December 8, 2009; **Accepted:** January 30, 2010; **Published:** February 18, 2010

Copyright: © 2010 Calmettes et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the "Centre National de la Recherche Scientifique, France", the "Région Aquitaine, France", and the "Université Bordeaux 2". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: guillaume.calmettes@rmsb.u-bordeaux2.fr (GC); philippe.diolez@rmsb.u-bordeaux2.fr (PD)

Introduction

During chronic hypoxia (CH), heart faces an increased workload as a result of the hypoxia-induced pulmonary hypertension under unfavorable conditions of decreased oxygen availability to oxidative cardiac metabolism. Pulmonary hypertension induces a right ventricular hypertrophy that may distort the left ventricle [1–3] and impair its function [1,2]. Along with global heart remodeling, complex structural, hormonal and biochemical modifications occur, concerning both energy-producing and energy-consuming processes in heart cells (see [4,5]). Studies on hearts of animals exposed to 3-week hypoxia reported an important reduction in mitochondrial mass (measured by the decrease in citrate synthase activity), associated with the reduction of the activities of respiratory chain complexes [6]. In parallel, a perturbation of calcium handling has been observed [7], leading to the decrease in calcium transients and therefore alteration of

contractility [7]. Those modifications are concomitant with a decrease in phosphorylated metabolites concentrations in CH hearts, mainly phosphocreatine (PCr) [8,9]. Altogether, these results evidence the development of a global heart failure in CH hearts [1,10,11].

However, adaptation to chronic hypoxia also represents a well-defined and reproducible mean to improve cardiac tolerance to ischemic and/or hypoxic conditions [12]. Indeed, hearts of chronically hypoxic animals develop smaller myocardial infarction [13] and exhibit better functional recovery [14] following ischemia compared with controls. Moreover, incidence and severity of arrhythmia developed during myocardial oxygen deprivation are strongly decreased in hearts from animals submitted to CH by contrast with controls [15].

Although the detailed mechanism remains poorly understood, improved cardiac bioenergetics appears as a potential candidate in this higher resistance of CH hearts to hypoxic insult (see [12,16]).

Particularly, CH-induced mitochondrial modifications such as enhanced expression of uncoupling protein 2 [17], increase in mitochondrial antioxidant enzymes [18], activation of mitoK_{ATP} channel [19], or regulation of cytochrome oxidase by nitric oxide production (see [12,16]) have been proposed to participate for maintaining resting potential, limit calcium influx, conserve cellular [ATP], and prevent excessive prolongation of action potential duration under hypoxic conditions (see [16]). Still, the overall effect as well as the relative importance of these various modifications induced by CH on heart energetics are still poorly documented, and their comprehension needs the development of experimental strategies aimed at the study of integrated organ physiology and pathophysiology.

In this context, the use of Top-down or Modular approaches of Metabolic Control Analysis (MCA, [20]) allows to overcome the complexity of intracellular regulations and could help to decipher the integration of molecular modifications developed during pathologies [21]. By combining MCA with non-invasive NMR spectroscopy, we are developing a new approach (MoCA, for Modular Control Analysis [22]) to describe the internal regulation of integrative energy metabolism in the intact beating heart. MoCA describes heart energetics on the basis of a supply-demand system (energy-production and -consumption connected by the energetic intermediates). Assessment of changes in [PCr] by ³¹P-NMR spectroscopy and in heart contractile activity allows the quantification of the integrated kinetic response (the elasticity) of supply and demand modules to [PCr] changes. MoCA may potentially provide the full description and quantification of the integrated regulatory effects of any modulation (even complex) of heart contractile activity [22]. Since recent evidence indicates that defects in communication between ATP-producing and ATP-consuming cellular sites are a major factor contributing to energetic deficiency in heart failure [23], tools such as MoCA, allowing study of the integrated cardiovascular function, are of particular interest [24]. Recently, we applied MoCA to study the effects of a 3-week CH on the energetics of contraction of intact perfused mouse hearts [8]. Despite the severe mitochondrial alteration after CH reported previously in the entire heart [6], MoCA evidenced an increased elasticity of the energy-producing processes (mainly mitochondria) in CH hearts leading to an improved response to an increase in energy demand [8]. The beneficial consequence of this surprising modification of mitochondrial regulation for integrative cardiac energetics is an unexpected decrease in the control exerted by energy-production on contraction which represents a clear positive adaptation of oxidative phosphorylation system to CH [8]. However, while this result strengthens the idea that mitochondrial energetics plays a crucial role in heart protection against chronic hypoxia, the direct relationship with CH-induced cardioprotection remains to be investigated. In the present study, we applied MoCA on isolated hearts of Control and CH hearts perfused under conditions of reduced oxygen concentration to investigate the advantages of the increased elasticity of energy-producing processes developed after CH for cardiac function during hypoxia.

Results

Changes in Body Weight, Heart Weight and Mitochondrial Content Induced by Chronic Hypoxia

Table 1 presents the modifications of body and heart weight for both Control and CH mice. As previously measured [8], an increase of the total heart weight to body weight ratio was observed in the mice used for this study at the end of a 3-week experimental period of exposure to hypoxia (table 1). This

Table 1. Effect of chronic hypoxia on mouse morphometrics and heart mitochondrial content.

	Control mice (n=7)	CH mice (n=6)
BW (g)	30.7±0.8	27.6±1.4*
HW (mg)	132±9	167±6**
RVW (mg)	26±3	68±5**
LVW (mg)	111±17	101±5*
HW/BW (x1000)	4.3±0.3	6.1±0.3**
CS activity (nmol/min/g)	140.5±13.9	115.3±13.7**

BW: Body weight. HW: Heart weight. RVW: Right ventricle weight. LVW: Left ventricle weight. CS: Citrate Synthase.

*p<0.05 and **p<0.01 between Control and CH mice.

doi:10.1371/journal.pone.0009306.t001

modification is mainly the consequence of the global heart remodeling in response to chronic hypoxia (i.e. increase in right ventricle mass associated with a decrease in left ventricle mass, table 1), also evidenced and described *in vivo* by us and others with magnetic resonance imaging [1,3] or doppler echocardiography [25].

Moreover, as suggested by the decrease in citrate synthase activity (table 1), surrogate of mitochondrial content, CH induced a significant decrease in heart mitochondrial content. Similar alteration of mitochondrial content has already been reported in rat heart after CH [6].

Modular Control Analysis (MoCA) of Hearts Under Low Oxygen

MoCA rationale states that steady states of metabolic systems are the direct consequence of the kinetic responses (elasticities) of the different modules in the system to changes in metabolic intermediates (see methods and [22] for details). In this study, the elasticity analysis was applied under low oxygen perfusion to Control and CH hearts. The mean values of the relative changes in [PCr] and RPP carried out experimentally for the determinations of the elasticities are presented in table 2.

Interestingly, the increase in balloon pressure induced a lower decrease in [PCr] (−8.9% vs −13.5%) for a higher increase in RPP (+20.0% vs +15.5%) in CH hearts when compared with Controls (table 2). On the contrary, inhibition of energy-production by NaCN/IAA injection induced comparable changes

Table 2. Experimental relative changes in [PCr] and in contractile activity under low oxygen, measured in Control and CH hearts after specific modulation of energy supply and demand.

		Control mice	CH mice
Reference Steady State	[PCr] (mM)	10.43±1.54	11.39±2.08
	RPP (mmHg/min)	18497±2255	17480±5429
Increase in balloon pressure	Δ [PCr]/[PCr] _i	−13.5%±5.8	−8.9%±1.6
	Δ RPP/RPP _i	+15.5%±11.3	+20.0%±8.7
NaCN/IAA inhibition	Δ [PCr]/[PCr] _i	−39.7%±12.9	−41.9%±8.9
	Δ RPP/RPP _i	−63.0%±9.8	−60.4%±7.3

i: initial.

doi:10.1371/journal.pone.0009306.t002

Table 3. Elasticities and corresponding control coefficients of energy supply and demand modules in Control and CH hearts under low oxygen conditions.

		Control mice (n = 7)	CH mice (n = 6)
Elasticities	Energy-supply	-0.89±0.41	-1.88±0.38**
	Energy-demand	2.09±0.66	1.73±0.62
Control coefficients (%)	Energy-supply	69±14	46±7*
	Energy-demand	31±14	54±7*

*P<0.05 and **P<0.01 between Control and CH hearts.
doi:10.1371/journal.pone.0009306.t003

in [PCr] (-41.9% vs -39.7%) and in RPP (-60.4% vs -63.0%) for CH and Control hearts (table 2).

The resulting elasticities for energy supply and demand modules, calculated from these relative changes, as well as the corresponding repartition of the control in the cardiac bioenergetics system, are reported in table 3 for both Control and CH groups. Under reduced oxygen availability, elasticity of energy supply was twice higher (in absolute value) in CH hearts compared with Controls (-1.88 vs -0.89, p<0.01, table 3), whereas the elasticity of energy demand was identical for both groups (2.09 vs 1.73, non significantly different, table 3). The direct consequence is that (i) not only the control exerted by energy supply on contraction is much lower in CH hearts than in Control (46 vs 69, p<0.05, table 3), but more importantly, (ii) that the repartition of the control on contraction in CH hearts is almost equally shared between energy supply and demand (46%–54%, table 3) whereas in Control hearts control of contraction is clearly shifted toward energy supply (69%–31%, table 3).

Modular Regulation Analysis of the Effect of Low Oxygen

Combined with previous MoCA analysis of Control and CH hearts under normal conditions of oxygen availability [8], the present results allows the quantification of the internal effects

(regulation analysis) of a decrease in oxygen on mouse cardiac bioenergetics for both Control and CH groups. Indeed, considering values from [8] as reference for mouse heart energetics, the measurement of the changes induced by any external effectors (e.g. hormone, pathology, etc) offers the possibility to access to internal regulations induced by this external effector on heart energetics (i.e. effects of decrease in oxygen availability in this study).

Figure 1 presents the energetic states of the perfused hearts of Control and CH mice under high and low oxygen conditions (respectively in [8] and the present work). Main observations deal with the difference in the effects of oxygen decrease on both energetic metabolites and contractile activity between control (figure 1A, 1B) and CH (figure 1C, 1D) hearts. As illustrated by the spectra presented in figure 1A, when Control hearts were perfused with low oxygen instead of high oxygen, a concomitant important increase in Pi and decrease in [PCr] (-23.4%, figure 1B) were measured, while ATP remained unchanged. Contractile activity was also affected with low oxygen as evidenced by the 46.2% decrease in RPP (figure 1B). This alteration in the contraction was the consequence of a simultaneous decrease in HR and in LVDP (figure 1B). By contrast with Control, CH heart bioenergetics was merely affected by the hypoxic insult. Indeed, in response to low oxygen, almost no changes in NMR spectrum of CH hearts were observed and only a slight increase in Pi was detected, while concentrations in PCr and ATP remained similar (figure 1C). Concerning contractile activity, while the decrease in HR under low oxygen conditions was comparable to Control, a significant increase in LVDP occurred (figure 1D). The consequence of these changes was a surprising constant RPP for CH hearts under low oxygen compared with high oxygen conditions (figure 1D).

The application of Modular Regulation Analysis [22,26] allows to quantify how decreasing oxygen availability triggers these changes in cardiac energetics in Control and CH hearts (see Text S1 for calculus). Results are presented in figure 2 both for Control (A) and CH (B) hearts. As described above, the total effect of low oxygen on Control hearts bioenergetics was a decrease of 46.2% in RPP, associated with a 23.4% decrease in [PCr] (figure 1B). This decrease by half of the contractile activity of the system is the consequence of two distinct effects induced by acute hypoxia on

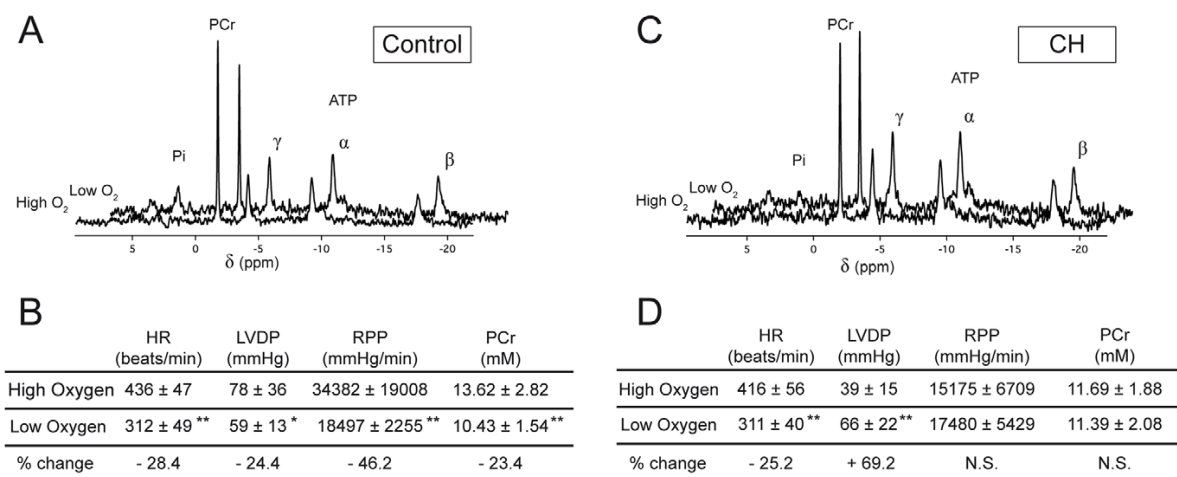


Figure 1. Energetic parameters of the perfused hearts of Control and CH mice under high and low oxygen conditions. Representative ³¹P-NMR spectra, corresponding PCr concentrations, and contraction parameters under high [8] and low oxygen perfusion for Control (A, B) and CH (C, D) hearts. *P<0.05 and **P<0.01 between high and low oxygen. N.S., non significantly different.
doi:10.1371/journal.pone.0009306.g001

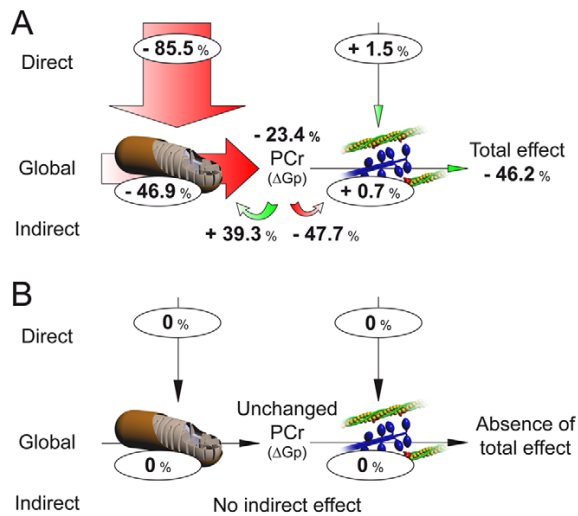


Figure 2. Modular Regulation Analysis of the effects of the decrease in oxygen availability on Control (A) and CH (B) mouse hearts. The size of the arrows is proportional to the effect of the decrease in oxygen availability, and the figures represent the effect expressed as % change from starting condition (high oxygen). doi:10.1371/journal.pone.0009306.g002

each module: (i) a direct effect of the decrease in oxygen on energy supply and demand, and (ii) an additional indirect effect on each module in response to the observed change in PCr concentration. Calculation of direct effect shows that decreasing oxygen availability strongly inhibits energy supply directly (-85.5% in our conditions) whereas energy demand is not affected ($+1.5\%$) (figure 2A). These effects are responsible for the drop in PCr concentration (-23.4%), which in turn causes indirect effects on both modules, depending on their respective elasticities to changes in PCr. Thus, this drop in PCr induces a strong positive effect on energy-supply ($+39.3\%$), that compensate in part for the strong direct negative effect induced by acute hypoxia on this module, and a strong negative effect on energy-demand (-47.7%) (figure 2A). The last information obtained from regulation analysis is the global response of heart contractile activity to the decrease in oxygen through each module. This global effect depends on the control coefficients and therefore quantifies how strongly the decrease in oxygen availability acts on the system through each module. Here, alteration induced by oxygen shortage on heart energetics essentially comes from energy supply inhibition with a global effect of -46.9% on contraction, whereas no effect is measured from energy demand ($+0.7\%$) (figure 2A).

Regarding CH hearts, due to the absence of modification in RPP or [PCr] following oxygen decrease (figure 1D), modular regulation analysis reflected this absence of effect as illustrated in figure 2B. This absence of effect of acute hypoxia on CH hearts is the consequence of the insensitivity of energy supply to our conditions of hypoxia compared with Control (figure 2).

Discussion

Constant heart muscle work requires efficient myocardial energetic regulation and matching between ATP consumption and production [27]. Cardiac metabolism principally rely on oxidative metabolism and adequate supply of oxygen and metabolic substrates is therefore a major prerequisite for normal

cardiac bioenergetics [23]. Indeed, although heart can stand some degree of hypoxia, this situation is incompatible with its normal bioenergetic function, and ischemic heart disease with compromised oxygen supply to the myocardium is a common cause of heart failure [23,28].

This idea is clearly illustrated in the present study by the concomitant severe decrease in contractile activity and PCr concentration measured in Control hearts perfused under low oxygen conditions compared with previously reported values [8] measured under high oxygen conditions (see figure 1). Similar alterations of cardiac energetics have already been described not only in isolated heart submitted to reduced O_2 -supply by decreasing coronary flow or PaO_2 in the medium [29,30], but also in the hypoxic myocardium of living rats [28].

However, in striking contrast with Control, CH hearts appeared insensitive to the decrease in oxygen and showed no modification either in PCr or in RPP when submitted to low oxygen perfusion. As evidenced by the regulation analysis of the effects of decreased oxygen availability on cardiac bioenergetics, this insensitivity of CH hearts to hypoxic stress is mainly the consequence of a surprising absence of direct effect of acute hypoxia on energy supply processes. This result indicates a specific modification in the bioenergetics of hypoxic hearts that compensate for decreased oxygen availability. Numerous studies previously showed that hearts adapted to chronic hypoxia are less prone to develop contractile dysfunctions, ventricular arrhythmia or myocardial infarction when submitted to acute oxygen deprivation (see [5,12,16]). Although the detailed mechanisms are poorly understood, adaptation of cardiac energy metabolism to hypoxic environment appears as a potential candidate in this higher resistance of CH hearts to hypoxic insult. Using the integrative tools of Modular Control Analysis (MoCA, [22]), we previously evidenced an increased kinetic response (elasticity) of energy production pathways to changes in [PCr] after chronic exposure to hypoxia [8], emphasizing a better responsiveness of energy supply to changes in ATP-demand in CH hearts. Advantages brought by this higher elasticity of energy-producing processes were not clearly figured out, but we proposed it as a mechanism developed to counteract the decrease in activity evidenced in CH hearts [8]. In the present study, when MoCA was applied to Control and CH hearts under conditions of reduced oxygen availability, a severe decrease in the elasticity of energy supply was measured in both groups compared with values measured under high oxygen conditions [8]. This result seems not surprising when considering the decrease in creatine kinase (CK) flux evidenced in hearts of living rats submitted to hypoxic ventilation [28], that could be responsible for an altered energy supply-demand matching. However, the higher elasticity of energy supply developed in CH hearts [8] appears to compensate this alteration and even under low oxygen conditions, energy supply elasticity remained twice higher as compared to Control. An important consequence is that, under low oxygen availability, the control exerted by energy-supply on contraction remains significantly lower in CH hearts compared with Control. This difference allows CH hearts to be characterized by a distribution of the control equally shared among energy supply and demand, as encountered in Control hearts under normal conditions of oxygenation [8].

Values of elasticities and control coefficients of a metabolic system are subject to a number of constraints and inter-relationships [20]. This relation, illustrated in figure 3, provides the keys to understand how the elasticities of energy supply and demand affect the distribution of control coefficients on contraction. If we plot the value of the elasticity of a module against that of the other module, the line passing through this point and the

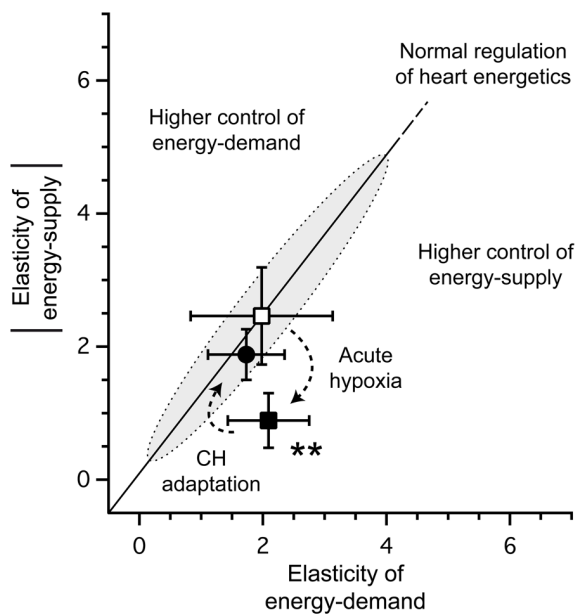


Figure 3. Elasticities plot of the adaptation of CH hearts to hypoxia. Open square: elasticities of Control hearts under high oxygen condition (energy supply: -2.46 ± 0.73 , energy demand: 1.98 ± 1.15 , values obtained from [8]). Solid square: elasticities of Control hearts in low oxygen condition (energy supply: -0.89 ± 0.41 , energy demand: 2.09 ± 0.66). Solid circles: elasticities of CH hearts in low oxygen condition (energy supply: -1.88 ± 0.38 , energy demand: 1.73 ± 0.62). Shadowed zone indicates normal control pattern (normal distribution of the control between energy supply and demand) in mouse heart energetics, as described in [8]. doi:10.1371/journal.pone.0009306.g003

origin describes the combinations of elasticities that give the same control pattern (figure 3). The effects of decreasing oxygen availability as well as CH adaptation on “normal” mouse heart energetics [8] could then be easily understood with this figure. Indeed, as illustrated, the decrease in energy supply elasticity induced by acute hypoxia on Control hearts, without any change in energy demand elasticity, move the system in a situation where control of energy supply on contraction becomes predominant (figure 3, acute hypoxia arrow). This situation is detrimental for cardiac bioenergetics and could be interpreted as energy deficiency, a situation encountered during heart failure [11,31]. However, because of the higher elasticity of energy-supply developed in heart during chronic hypoxia, the effect of acute hypoxia is compensated (figure 3, chronic hypoxia arrow) and bioenergetics of CH heart keeps the same control distribution among energy supply and demand under low oxygen availability than healthy hearts under normal oxygen conditions. An important consequence is the absence of effect of decreased oxygen availability on energy-supply in CH hearts evidenced by Modular Regulation Analysis (figure 2).

Consequently, the marked increase in energy supply elasticity observed in CH hearts may be considered as an adaptive mechanism developed in the heart which counteracts the decrease in activity and protects CH hearts from oxygen shortage. Modifying the mechanisms responsible for energy production elasticity appears as a possible mean to maintain a balanced control pattern (“normal” control shared by energy-supply and demand) on contraction, and to ensure sufficient flexibility to

adapt to new conditions. The most obvious process whose modifications may be responsible for the change in the kinetic interaction between energy production and PCr is the ANT-miCK-porin complex, which is at the interface between mitochondria and the energetic intermediates, including Cr/PCr. An improved coupling between all the components of this complex may lead to a more efficient matching of energy-supply to energy-demand. As suggested by this study, this improved communication between ATP supply and demand pathways is likely a key strategy to limit hypoxia-induced energetic alterations. This adaptation may ensure the preservation of the normal control pattern and regulation of energy supply and demand under the unfavorable conditions of oxygen availability.

Understanding the regulation and control of complex network of reactions requires analytical tools that take into account the interactions between individual network components controlling global network function. We believe that this holistic view of cardiovascular metabolism as a modular dynamic network may be conceptually useful for illuminating the basis of biological pathology and adaptation phenomena.

Methods

Ethics Statement

All animal work has been conducted according to relevant international and national guidelines in accordance with the recommendations of the Weatherall report, “The use of non-human primates in research”. All the protocols used were approved by our local ethics committee named Comité d’éthique régional d’Aquitaine. The corresponding license number is P.D. 3308010 (03/17/1999).

Chronic Hypoxia

Female Swiss mice (6 weeks, 18–23 g) were separated into two groups. One group (chronic hypoxic mice, CH, $n = 6$) was exposed to a simulated altitude of 5500 m (barometric pressure 380 mmHg) in a hypobaric chamber for 21 days. The other group (normoxic mice, Control, $n = 7$) was maintained under ambient normoxic conditions ($F_{iO_2} = 21\%$), with the same 12:12H light-dark cycles. Free access to a standard mice diet and water was allowed throughout the exposure period.

Isolated Perfused Heart Perfusion

As previously described [8], once excised, hearts were immediately cannulated and retrogradely perfused at a constant pressure of 90 mmHg with warm (37°C), Krebs-Henseleit buffer (in mmol/L: NaCl 108, KCl 5.9, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 25, EDTA 0.5, Mannitol 1.1, Glucose 10, Pyruvate 5 and CaCl_2 2.5, pH 7.35). The medium was equilibrated at a low PO_2 ($\text{PO}_2 = 100\text{--}120$ mmHg, medium air-equilibrated), to study hearts under conditions of reduced oxygen availability [32] compared to normal perfusion conditions ($\text{PO}_2 = 550\text{--}600$ mmHg, medium saturated with 95% O_2 - 5% CO_2). The hearts were allowed to beat spontaneously. Heart rate (HR) and left ventricle developed pressure (LVDP) were measured continuously with a fluid-filled balloon inserted into the left ventricle. Mechanical performance of the heart was evaluated as the product of HR and LVDP (RPP, in mmHg/min). All measurements were performed after a 20 min stabilization period.

NMR Measurement

Pulsed Fourier-transformed ^{31}P NMR spectra were obtained using a 11.7 T superconducting magnet (Bruker, Karlsruhe, Germany). Hearts were inserted into a heated (37°C) $^1\text{H}/^{31}\text{P}$

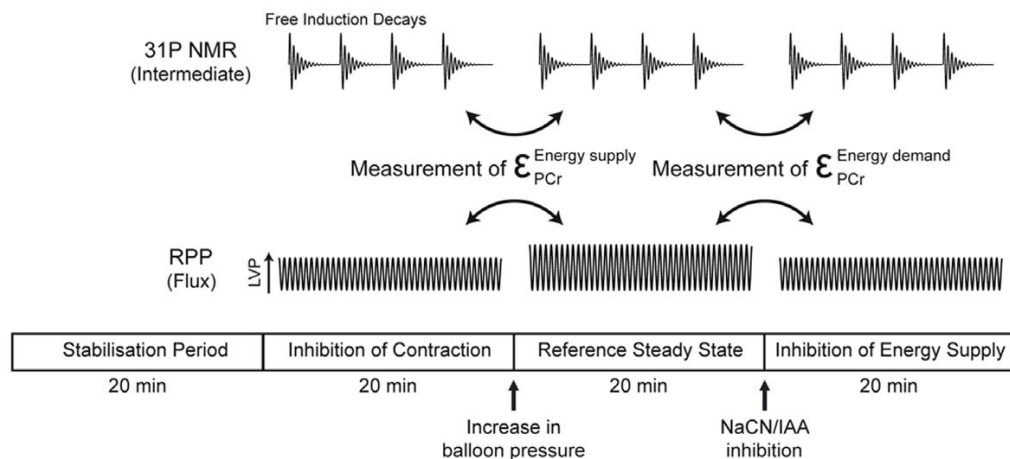


Figure 4. Experimental protocol for the measurement of both energy supply and demand elasticities in each heart. All measurements were performed after a 20 min stabilization period.
doi:10.1371/journal.pone.0009306.g004

double-tuned 10 mm probe. The probe was tuned to the 202.4 MHz phosphorus resonance frequency. Partially saturated ^{31}P NMR spectra (13 μs RF pulse, 60° flip angle, 2 s repetition time, 4096 data points, reception bandwidth 6460 Hz, 150 acquisitions) were obtained in 5 min without proton decoupling. The resonance area corresponding to ATP, PCr, and inorganic phosphate (Pi) were fitted to Lorentzian functions and calculated using a commercially available program (Igor Pro, Wavemetrics). By comparing the areas under the peaks from fully relaxed (recycle time 17.5 s) and those of partially saturated (recycle time 2 s) spectra, correction factors for saturation were calculated for ATP (1.0), PCr (1.2) and Pi (1.15). The β -ATP resonance area was fixed at 11.8 mmol/L [33] for the first spectra and used for internal calibration of the NMR spectra.

MoCA (Modular Control and Regulation Analysis)

The principles of the application of MoCA on muscle bioenergetics have been extensively described elsewhere for heart [8,22,34,35] and skeletal muscle [36,37] and only a short description will be found here (for a thorough description of the MoCA approach and the equations used, see [22] and Text S1). MoCA describes heart energetics on the basis of a supply-demand system (energy-production and -consumption pathways connected by energetic intermediates). Assessment of specific changes in [PCr] (representative of the changes in ΔG_p) by ^{31}P -NMR spectroscopy and in contractile activity allows the quantification of the integrated kinetic response (the elasticity) of supply and demand modules. In the present study, elasticities of energy supply and demand of Control and CH hearts under low oxygen perfusion were determined similarly to [8] respectively after increase in balloon volume and injection of low cyanide concentration (NaCN, 0.3 mM) combined with iodoacetic acid (IAA, 75 μM). The experimental protocol allowing the measurement of both elasticities for each heart is summarized in Figure 4. The control coefficients of both modules on heart contraction were calculated from these elasticities according to the summation and connectivity theorems [20].

Moreover, MoCA may potentially provide the full description and quantification of the integrated regulatory effects of any modulation of heart contractile activity (Regulation Analysis, [22,26]). Here we applied this analysis to study the effects of the lowering in oxygen on heart energetics of Control and CH mice. Effects of the lowering in oxygen were quantified in terms of Direct

Effect (total effect on the energetic system minus the Indirect Effect on each modules due to PCr changes) and Global Effect [22].

Enzyme Assays

At the end of each experiment, hearts were rapidly freeze-clamped with tongs cooled in liquid nitrogen and stored frozen at -80°C for later determination of enzyme activity. Immediately after thawing, tissue samples were minced with scissors, placed into ice-cold solution (50 mg wet weight per 1 mL) containing (mM): Tris-HCl buffer, 0.1; EGTA, 1; pH 8.1, and homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer. Tissue homogenates were incubated for 60 min at 0°C for complete enzyme extraction and centrifuged at $13,000\times g$ for 20 min. The supernatant was used for enzyme determination. Citrate synthase (E.C. 4.1.3.7) was determined by the method of Srere [38]. Assays were performed at 30°C . Each determination was carried out in triplicate.

Statistical Analysis

Experimental values are reported as means \pm SD. Statistical comparison between groups (CH vs. Control) and perfusion conditions (high vs. low oxygen) was performed by one-way ANOVA and post-hoc Tukey HSD tests. $p < 0.05$ and $p < 0.01$ stand for significant difference levels.

Supporting Information

Text S1 Application of Modular Control and Regulation Analysis to isolated perfused heart of mouse.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009306.s001 (0.05 MB DOC)

Acknowledgments

The authors thank Roger Marthan for helpful discussions and are grateful to Yannick Chatenet's participation for drawings.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GC ET PD. Performed the experiments: GC GG SM. Analyzed the data: GC VDA GG SM ET PD. Contributed reagents/materials/analysis tools: BM JMF. Wrote the paper: GC VDA PD.

References

- Gibbs JS (2007) Biventricular function at high altitude: implications for regulation of stroke volume in chronic hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 618: 13–24.
- Itoh A, Tomita H, Sano S (2009) Doppler echocardiographic assessment of left ventricular diastolic function in chronic hypoxic rats. *Acta Med Okayama* 63: 87–96.
- Miriaux S, Calmettes G, Massot P, Lefrancois W, Parzy E, et al. (2009) 4D retrospective black blood trueFISP imaging of mouse heart. *Magn Reson Med* 62: 1099–1105.
- Essop MF (2007) Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol* 584: 715–726.
- Ostadal B, Kolar F (2007) Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia: beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol* 158: 224–236.
- Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, et al. (2005) Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* 66: 132–140.
- Pei JM, Kravtsov GM, Wu S, Das R, Fung ML, et al. (2003) Calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during chronic hypoxia: a time course study. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1420–1428.
- Calmettes G, Deschodt-Arsac V, Thiaudiere E, Muller B, Dirolez P (2008) Modular control analysis of effects of chronic hypoxia on mouse heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1891–1897.
- Rossi A, Lortet S (1996) Energy metabolism patterns in mammalian myocardium adapted to chronic physiopathological conditions. *Cardiovasc Res* 31: 163–171.
- Morris-Thurgood JA, Frenneaux MP (2000) Diastolic ventricular interaction and ventricular diastolic filling. *Heart Fail Rev* 5: 307–323.
- Neubauer S (2007) The failing heart—engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: 1140–1151.
- Kolar F, Ostadal B (2004) Molecular mechanisms of cardiac protection by adaptation to chronic hypoxia. *Physiol Res* 53 Suppl 1: S3–13.
- Meerson FZ, Gomzakov OA, Shinkovich MV (1973) Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol* 31: 30–34.
- Tajima M, Katayose D, Besho M, Ioyama S (1994) Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc Res* 28: 312–319.
- Asemu G, Neckar J, Szarszoi O, Papousek F, Ostadal B, et al. (2000) Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. *Physiol Res* 49: 597–606.
- Corbucci GG, Marchi A, Lettieri B, Luongo C (2005) Mechanisms of cell protection by adaptation to chronic and acute hypoxia: molecular biology and clinical practice. *Minerva Anesthesiol* 71: 727–740.
- McFalls EO, Sluiter W, Schoonderwoerd K, Manintveld OC, Lamers JM, et al. (2006) Mitochondrial adaptations within chronically ischemic swine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 41: 980–988.
- Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, et al. (1995) Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol* 489 (Pt 3): 869–876.
- Neckar J, Szarszoi O, Kolen L, Papousek F, Ostadal B, et al. (2002) Effects of mitochondrial K(ATP) modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* 55: 567–575.
- Fell DA (1992) Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem J* 286 (Pt 2): 313–330.
- Weiss JN, Yang L, Qu Z (2006) Systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders: network perspectives of cardiovascular metabolism. *J Lipid Res* 47: 2355–2366.
- Dirolez P, Deschodt-Arsac V, Raffard G, Simon C, Santos PD, et al. (2007) Modular regulation analysis of heart contraction: application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R13–19.
- Dzeja PP, Redfield MM, Burnett JC, Terzic A (2000) Failing energetics in failing hearts. *Curr Cardiol Rep* 2: 212–217.
- Weiss JN, Qu Z, Garfinkel A (2003) Understanding biological complexity: lessons from the past. *FASEB J* 17: 1–6.
- Reboul C, Tanguy S, Juan JM, Dauzat M, Obert P (2005) Cardiac remodeling and functional adaptations consecutive to altitude training in rats: implications for sea level aerobic performance. *J Appl Physiol* 98: 83–92.
- Brand MD (1997) Regulation analysis of energy metabolism. *J Exp Biol* 200: 193–202.
- Balaban RS (1990) Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol* 258: C377–389.
- Bitl JA, Balschi JA, Ingwall JS (1987) Contractile failure and high-energy phosphate turnover during hypoxia: ³¹P-NMR surface coil studies in living rat. *Circ Res* 60: 871–878.
- Merati G, Allibardi S, Monti LD, de Jong JW, Samaja M (1996) Dynamics of myocardial adaptation to low-flow ischemia and hypoxemia. *Am J Physiol* 271: H2300–2305.
- Samaja M, Casalini S, Allibardi S, Corno A, Chierchia SL (1994) Regulation of bioenergetics in O₂-limited isolated rat hearts. *J Appl Physiol* 77: 2530–2536.
- Ingwall JS (2006) On the hypothesis that the failing heart is energy starved: lessons learned from the metabolism of ATP and creatine. *Curr Hypertens Rep* 8: 457–464.
- Poizat C, Keriell C, Cuchet P (1994) Is oxygen supply sufficient to induce normoxic conditions in isolated rat heart? *Basic Res Cardiol* 89: 535–544.
- Dos Santos P, Aliev MK, Dirolez P, Duclos F, Besse P, et al. (2000) Metabolic control of contractile performance in isolated perfused rat heart. Analysis of experimental data by reaction:diffusion mathematical model. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1703–1734.
- Korzeniewski B, Deschodt-Arsac V, Calmettes G, Franconi JM, Dirolez P (2008) Physiological heart activation by adrenaline involves parallel activation of ATP usage and supply. *Biochem J* 413: 343–347.
- Vogt AM, Poolman M, Ackermann C, Yildiz M, Schoels W, et al. (2002) Regulation of glycolytic flux in ischemic preconditioning. A study employing metabolic control analysis. *J Biol Chem* 277: 24411–24419.
- Arsac LM, Beuste C, Miriaux S, Deschodt-Arsac V, Thiaudiere E, et al. (2008) In vivo modular control analysis of energy metabolism in contracting skeletal muscle. *Biochem J* 414: 391–397.
- Beuste C, Miriaux S, Deschodt-Arsac V, Thiaudiere E, Franconi JM, et al. (2009) Modular regulation analysis of integrative effects of hypoxia on the energetics of contracting skeletal muscle in vivo. *Biochem J*.
- Srere PA (1969) [1] Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. pp 3–11.

Quatrième partie

DISCUSSION - PERSPECTIVES

DISCUSSION

1

Ce travail présente la première application de l'approche intégrative développée par notre équipe, l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA, (Diolez et al. 2007)), sur coeur isolé perfusé de souris. Le développement et la validation de l'approche sur le modèle murin est en effet une étape cruciale pour pouvoir étudier de manière plus fine les mécanismes mis en jeu dans les différentes pathologies (modèles de souris transgéniques, ...) et ainsi offrir l'opportunité du développement de stratégies diagnostiques et thérapeutiques.

1.1 PARTICULARITÉS DE L'ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE DE LA SOURIS

Le coeur isolé perfusé est un modèle depuis longtemps utilisé pour l'étude de la fonction cardiaque, normale ou pathologique. Ce modèle expérimental est particulièrement utilisé sur le rat, mais son application est de plus en plus développée sur souris afin d'accéder aux bases mécanistiques des pathologies à l'aide de modèles transgéniques (Ytrehus 2000). Toutefois, la mise au point du modèle du coeur isolé perfusé de souris reste un challenge expérimental (Sutherland et al. 2003) et requiert notamment des conditions expérimentales spécifiques par rapport aux coeurs des autres mammifères. En particulier, le choix des substrats utilisés est particulièrement important afin de permettre des états stables de fonctionnement cardiaque.

Chez le rat, nos études antérieures ont montré des différences de fonctionnement cardiaque en fonction du substrat utilisé dans le milieu de perfusion, par exemple entre glucose et pyruvate (Diolez et al. 2002). A haut niveau d'activation cardiaque ($Ca^{2+} = 3,5 \text{ mM}$), le travail cardiaque - estimé à partir du produit de la fréquence cardiaque par la pression développée (PPF) - est ainsi plus important lorsque le pyruvate est utilisé, et ce travail est associé à une consommation d'oxygène également plus importante (Diolez et al. 2002). Plus récemment, nous avons également mis en évidence sur coeur de rat l'influence de l'utilisation de différents substrats sur l'ensemble de l'énergétique cardiaque (Korzeniewski et al. 2009b). Dans cette étude, la composition du milieu de perfusion a ainsi un très fort retentissement sur les propriétés cinétiques du système énergétique, et en particulier sur la phosphorylation oxydative (Korzeniewski et al. 2009b).

Pour le coeur de souris, l'apport du glucose (associé ou non à du pyruvate) comme substrat dans le milieu de perfusion s'est révélé être une condition indispensable au

maintien d'un état stable de contraction cardiaque (Sutherland et al. 2003). Cette particularité pourrait être la conséquence du niveau de travail du coeur de souris. En effet, malgré une taille et une masse ≈ 10 fois plus petite que le coeur de rat, la valeur de PPF est sensiblement identique à celle mesurée sur coeur de rat. Cette très forte activité du coeur de souris est la conséquence d'une fréquence cardiaque très élevée (≈ 600 bpm par rapport à ≈ 300 bpm pour le rat). Ainsi, l'énergie nécessaire pour le fonctionnement normal d'un coeur de souris est très importante, et, comme suggéré par la nécessité de la perfusion en glucose, la production d'énergie par la glycolyse semble donc jouer un rôle important. Cela a d'ailleurs été confirmé par nos expériences lors de la mise au point de l'approche MoCA sur coeur de souris. En effet, contrairement au coeur de rat dans lequel une inhibition partielle de l'activité mitochondriale (injection de cyanure à de faibles concentrations) suffit à induire une inhibition suffisante du module Producteur pour accéder à la détermination de l'élasticité du module Consommateur (Diolez et al. 2007), dans les coeurs de souris, l'injection de cyanure doit être combinée à une injection de iodoacétate (à une concentration induisant l'inhibition totale de l'activité glycolytique) pour que l'on puisse observer un effet sur la contraction cardiaque (Calmettes et al. 2008).

L'analyse Modulaire du Contrôle (MoCA, (Diolez et al. 2007)) développée par notre équipe permet de décrire et de comprendre le système énergétique cardiaque de manière intégrée sur coeur battant. A partir de la définition du système en deux modules, Producteur et Consommateur d'énergie (représentée par les variations de [PCr]), du suivi de l'intermédiaire énergétique (PCr) et de la quantification du flux énergétique traversant le système (PPF), le calcul des coefficients d'élasticité nous permet d'analyser la réactivité de chacun des modules face à une modification des intermédiaires énergétiques. Dans cette thèse, l'application de MoCA sur des coeurs de souris contrôles a mis en évidence un fonctionnement énergétique particulier chez les murins. En effet, par comparaison avec les résultats obtenus sur coeur de rat (Diolez et al. 2007) nous avons démontré que les valeurs d'élasticité des deux modules sont très différentes chez les souris. De plus, ces différences impliquent également une distribution du contrôle exercé par chacun des modules sur le flux très spécifique en comparaison avec le rat. Ainsi, alors que le contrôle de la contraction réside très majoritairement ($\approx 90\%$) dans les processus de consommation d'énergie chez le rat (Diolez et al. 2007), nos expériences ont montré un contrôle partagé ($\approx 50\% - 50\%$) entre les modules Producteur et Consommateur chez la souris (Calmettes et al. 2008). Même si les valeurs des élasticités (et donc des coefficients de contrôles, calculés à partir de ces élasticités) sont modifiées par le substrat utilisé dans le milieu de perfusion chez le rat (Diolez et al. 2007), la différence entre les coeurs de rats et de souris ne peut cependant pas être expliquée uniquement par cette différence de substrats. En effet, même lorsque le glucose seul est utilisé comme substrat pour le coeur de rat, le contrôle de la contraction réside toujours majoritairement au niveau du module Consommateur ($\approx 80\%$, (Diolez et al. 2007)). La différence observée entre

les coeurs de rat et souris reflète donc bien une particularité du modèle murin plutôt que des différences dans les conditions expérimentales.

La différence des élasticités mesurées sur coeur de rat et souris pourrait être expliquée par la très forte fréquence cardiaque de la souris comparée à celle du rat, impliquant alors une gestion calcique différente entre ces deux rongeurs durant le processus d'excitation-contraction. Nos récentes expériences sur coeur de cobayes (Deschodt-Arsac et al., *résultats en cours de publication*), étudiés en condition de fonctionnement autonome ou en condition de fréquence cardiaque fixée par un générateur d'impulsion électrique (système de pacing) tendent à renforcer cette hypothèse puisque des élasticités différentes ont été déterminées dans les deux situations.

1.2 COEUR DE SOURIS EN SITUATION D'HYPOXIE CHRONIQUE

Les modifications intégrées de l'énergétique cardiaque induites par l'hypoxie chronique ont été étudiées en comparant un modèle de souris hypobares (Leblais et al. 2008, Delannoy et al. 2010) (souris hébergées 21 jours dans un caisson où la pression partielle d'O₂ était diminuée de moitié) à des souris contrôles.

Une situation d'hypoxie chronique induit des modifications importantes de la fonction cardiaque (Ostadal and Kolar 2007, Essop 2007). En particulier, le développement d'une hypertension artériopulmonaire est à l'origine d'un remodelage cardiaque global qui affecte les deux ventricules. Cette modification anatomique a été confirmée avec notre étude *in vivo* par IRM (Miraux et al. 2009) dans laquelle l'hypertrophie et la dilatation du ventricule droit secondaires à l'HTAP, ainsi que la diminution du volume intraventriculaire gauche par refoulement du septum vers cette cavité (Gibbs 2007), ont été mises en évidence sur notre modèle. A notre connaissance, l'utilisation de l'imagerie pour la détection des modifications anatomiques cardiaques induites par l'hypoxie chronique sur souris *in vivo* n'avait jamais été réalisée auparavant, et seules des données acquises par échocardiographie doppler sur rat étaient disponibles (Reboul et al. 2005, Itoh et al. 2009). Toutefois, ces études ne présentent que la description des modifications des volumes intraventriculaires cardiaques, alors que nous avons également corrélé les volumes mesurés (μL) par IRM des masses ventriculaires myocardiques aux masses de ces mêmes ventricules pesées *ex vivo* (tableau 2 dans (Miraux et al. 2009)).

Outre une modification globale de l'anatomie cardiaque, l'hypoxie chronique induit d'importantes répercussions sur l'énergétique comme montré par la très forte diminution du niveau de contraction cardiaque mesurée sur notre modèle de souris hypobares en comparaison avec des souris contrôles (Calmettes et al. 2008). Cette diminution de travail, mesurée sur les coeurs hypoxiques en conditions normoxiques, semble être la conséquence d'adaptations lentes à l'hypoxie, puisque, chez des rats exposés à 14 jours d'hypoxie seule une tendance est observée (Zungu et al. 2007), celle-ci devenant par contre très significative après 28 jours d'hypoxie (Zungu et al. 2008). Ce moindre travail cardiaque, a pu être expliqué par des modifications énergé-

tiques sévères telles qu'une diminution de la masse mitochondriale, des modifications de [PCr] et du contenu en créatine totale, ainsi qu'une altération de la gestion des mouvements du calcium par les cardiomyocytes. Ainsi, nous avons mesuré une diminution de la masse mitochondriale (montrée par une diminution de l'activité de la citrate synthase) sur notre modèle de souris hypobares (Calmettes et al. 2010), modification également rapportée dans la littérature sur coeur de rat (Nouette-Gaulain et al. 2005). Cette altération est susceptible d'avoir d'importantes conséquences pour la bioénergétique cardiaque, étant donné le rôle crucial des mitochondries au niveau de la production d'énergie pour le muscle cardiaque (Balaban and Heineman 1989, Balaban 1990). Une diminution du contenu en phosphocréatine sans modification d'ATP, mise en évidence à la fois par spectroscopie RMN dans notre travail (Calmettes et al. 2008) et celui d'autres auteurs (Novel-Chaté et al. 1995), et par mesures biochimiques sur des extraits de coeur (Rossi and Lortet 1996, Novel-Chaté et al. 1998), a également été constatée après hypoxie chronique. Cette diminution de [PCr] est associée à une diminution du contenu total en créatine après adaptation à l'hypoxie chronique (Rossi and Lortet 1996, Novel-Chaté et al. 1998). Il est intéressant de noter qu'une diminution similaire du contenu en créatine totale est observée sur les modèles d'hypertrophie sans hypoxie (Do et al. 1997), ce qui ne nous permet pas de conclure sur la causalité directe entre hypoxie et baisse de PCr. Dans le coeur, le système des créatines kinases joue un rôle thermodynamique important à l'origine du maintien d'un ΔG_p élevé au niveau des sites de consommation d'énergie. A la vue des modifications de contenu total en créatine et [PCr], la modification potentielle du ΔG_p après hypoxie chronique reste à étudier étant donné son lien avec le rapport PCr/Cr .

Une altération de la gestion calcique, avec notamment une diminution des transients calciques lors du couplage excitation-contraction est également rapportée après hypoxie chronique (Pei et al. 2003). Notre équipe a récemment démontré pour la première fois *in situ* l'activation parallèle de la production et de la consommation d'énergie par le calcium dans le coeur de rat (Diolez et al. 2007). L'analyse MoCA réalisée alors, a non seulement démontré qu'une activation parallèle du Producteur et du Consommateur avait lieu lors de l'activation cardiaque par le calcium, mais aussi que l'effet inotrope était essentiellement la conséquence de l'action du calcium sur les myofilaments, du fait de la répartition spécifique du contrôle sur le flux reposant majoritairement sur ce module consommateur (Diolez et al. 2007). L'activation mitochondriale par le calcium (même si elle a un effet négligeable sur le niveau de contraction) est cependant essentielle pour le maintien de l'homéostasie des intermédiaires énergétiques et donc plus globalement pour la bioénergétique cardiaque. De ce fait, les modifications de la gestion calcique lors de l'hypoxie chronique ont certainement des répercussions sur l'ensemble de l'énergétique, comme le suggère la diminution du travail cardiaque mesurée sur coeurs hypoxiques (Zungu et al. 2008, Calmettes et al. 2008). Cette modification au niveau du travail cardiaque pourrait être expliquée par une moindre activation du Consommateur par le calcium, mais

également du Producteur qui, chez la souris, détient la moitié du contrôle sur la contraction.

La multitude des modifications rapportées après hypoxie chronique démontre la complexité de l'adaptation cardiaque à cette condition. L'utilisation de MoCA sur des coeurs hypoxiques permet alors d'obtenir des informations intégrées, par la description et la quantification de l'ensemble des régulations internes développées lors de cette adaptation à l'hypoxie.

MoCA, appliquée à l'énergétique cardiaque des coeurs de souris hypoxiques (perfusion normoxique) révèle une forte augmentation (en valeur absolue) de l'élasticité du module Producteur (Calmettes et al. 2008), traduisant une plus forte réponse du Producteur face à une diminution de [PCr]. Expérimentalement, cette élasticité est calculée à partir d'une augmentation de l'activité du Producteur par Effet Frank Starling, réalisée en augmentant le volume du ballonnet inséré dans le ventricule gauche : l'étirement des fibres implique une augmentation de la sensibilité de la troponine C au calcium, ce qui se traduit *in fine* par une plus forte contraction. Dans les coeurs hypobares, l'augmentation du volume du ballonnet induit une plus faible diminution de [PCr] par rapport aux coeurs contrôles. De plus, cette plus faible baisse de l'intermédiaire est associée à une augmentation 2 fois plus importante de la PPF, flux traversant le système énergétique, ce qui rend compte de la réponse 2 fois plus importante du Producteur. Cette augmentation de réponse n'est pas la conséquence d'une augmentation plus importante du volume intraventriculaire (et donc d'un effet Frank Starling plus important), puisqu'au contraire elle fait suite à un plus faible gonflement du ballon (+ 7,5 μ L vs + 10 μ L, (Calmettes et al. 2008)). Ainsi, même pour une modulation moins importante imposée au Consommateur (augmentation plus petite du volume du ballon), la réponse des coeurs hypoxiques est deux fois plus grande que la réponse des coeurs contrôles (Calmettes et al. 2008). Comme montré sur cardiomyocytes, l'adaptation à l'hypoxie chronique ne modifie ni la sensibilité des myofilaments au calcium induite par un étirement (Cazorla et al. 2006), ni la concentration calcique basale dans le cytosol (Pei et al. 2003). Ces résultats démontrent alors que l'augmentation d'élasticité mesurée semble bien une conséquence de l'adaptation cardiaque à l'hypoxie chronique et non un artefact expérimental (utilisation du mécanisme Frank Starling par augmentation du volume du ballonnet).

Dans la littérature, et comme mesuré par nos expériences d'activité enzymatique dans (Calmettes et al. 2010), l'exposition prolongée à l'hypoxie est responsable d'une diminution significative de la masse mitochondriale et de l'altération de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Nouette-Gaulain et al. 2005). Les mitochondries étant intégrées dans le module Producteur, ces études sous-entendraient par exemple une diminution de la capacité mitochondriale à répondre à une augmentation de la demande en énergie. Or, l'application de MoCA révèle au contraire une augmentation de l'élasticité du module Producteur par rapport aux changements d'intermédiaires énergétiques et donc une amélioration de la réactivité du Producteur (Calmettes et al. 2008). Ce résultat met en valeur l'existence de processus adaptatifs spécifiques au

sein du module Producteur lors de l'exposition prolongée à l'hypoxie puisque toute modification d'élasticité d'un module traduit une modification de processus intégrés dans le module ayant un impact fonctionnel (Brand 1997). L'augmentation de l'élasticité du Producteur pourrait donc traduire le développement de mécanismes moléculaires spécifiques tendant à compenser les effets de la perte mitochondriale. L'hypothèse que nous avons privilégiée est un meilleur couplage du complexe ANT-miCK-VDAC qui induirait une plus grande sensibilité mitochondriale par rapport à la PCr (Calmettes et al. 2008; 2010). Des études ont en effet montré que la modulation des sites de contacts des membranes mitochondriales via un couplage miCK-ANT était sensible à différents facteurs, et en particulier le calcium (Schlattner et al. 2001). Une augmentation de ces sites de contacts développée pendant adaptation à l'hypoxie chronique, favorisant le couplage miCK-ANT, pourraient ainsi expliquer la plus grande sensibilité mitochondriale aux variations d'intermédiaires énergétiques. Dans une étude sur fibres perméabilisées de coeurs hypoxiques, Field et al. (1994) montrent une augmentation de 20 % de l'activité de la miCK, corrélée avec l'augmentation de l'affinité mitochondriale à l'ADP. Ces auteurs proposent qu'une des modifications de l'acclimatation à l'hypoxie chronique sur leur modèle serait une plus grande efficacité du transfert énergétique à travers un meilleur couplage ANT-miCK (Field et al. 1994). Cette modification a été proposée pour expliquer la plus faible diminution de [PCr] pour une même augmentation de travail cardiaque suite à une stimulation β -adrénergique mesurée sur coeur isolé perfusé de rat hypoxique (Novel-Chaté et al. 1995). Cependant, en poussant leur analyse, Novel-Chaté et al. (1998) observent une plus petite stimulation de la respiration mitochondriale à l'ADP par l'addition de créatine sur fibres isolées perméabilisées de coeur de rat hypoxique, suggérant ainsi qu'aucune amélioration du couplage ANT-miCK n'est développée lors de l'adaptation à l'hypoxie chronique sur ce système isolé. L'hypothèse de la dépendance de l'élasticité au couplage miCK-ANT reste donc à étudier de manière plus approfondie.

Contrairement à ce qui se passe pour le Producteur, aucune modification d'élasticité du module Consommateur n'est mesurée sur notre modèle hypoxique par rapport aux coeurs contrôles. Le développement de l'hypertrophie ventriculaire droite induite par l'acclimatation à l'hypoxie chronique s'accompagne cependant d'une modification du profil protéique dans les deux ventricules, aussi bien au niveau du matériel contractile (Pissarek et al. 1997, Ostadal and Kolar 2007) que des protéines ATPases du réticulum sarcoplasmique (Pei et al. 2003). Toutefois, comme le montre l'absence de changement de l'élasticité du module Consommateur, ces modifications physiologiques ne semblent pas avoir, à notre niveau d'intégration, de répercussions sur l'énergétique cardiaque, puisque la réactivité des processus consommateurs de PCr par rapport à l'intermédiaire n'est pas altérée.

Ainsi, l'application de MoCA sur le modèle du coeur hypoxique chronique montre bien l'intérêt d'utiliser des approches intégratives pour étudier les systèmes complexes (et leurs modifications induites par un changement de conditions exté-

rieures) puisque cette approche nous a permis d'identifier la modification émergente de l'adaptation à l'hypoxie chronique traduite par l'augmentation de l'élasticité du Producteur mesurée dans les coeurs de souris hypoxiques.

1.3 ANALYSE MoCA DES COEURS EN CONDITION D'HYPOXIE AIGÛE

Afin analyser l'intérêt potentiel pour l'énergétique cardiaque de cette surprenante augmentation d'élasticité du Producteur, il nous a semblé intéressant d'étudier les coeurs contrôles et hypoxiques dans des conditions correspondantes à celles ayant induit cette modification d'élasticité (environnement hypoxique → hypoxie aigüe dans le perfusât). L'application de MoCA sur des coeurs perfusés avec un milieu dont la concentration en O_2 a été réduite, montre alors une diminution de l'élasticité du Producteur dans les coeurs contrôles et hypoxiques, toujours sans modification de l'élasticité du Consommateur (Calmettes et al. 2010). La conséquence directe de ce changement d'élasticité est une modification de la répartition du contrôle dans ces conditions d'hypoxie aigüe, avec l'augmentation du contrôle du Producteur sur la contraction (Calmettes et al. 2010).

Cependant, pour les souris hypobares, même si la baisse d'élasticité du Producteur induite par l'hypoxie aigüe est plus importante, cette valeur reste toujours 2 fois plus importante que chez les souris contrôles (Calmettes et al. 2010). De plus, il est intéressant de noter que cette valeur d'élasticité du Producteur chez les souris hypoxiques en conditions d'hypoxie aigüe est similaire à la valeur d'élasticité obtenue chez les souris contrôles en conditions normoxiques dans notre précédente étude (Calmettes et al. 2008). Ainsi, en rétablissant expérimentalement les conditions d'hypoxie auxquelles les souris ont été exposées 21 jours par la diminution de la pression partielle d' O_2 dans le milieu de perfusion ($600 \text{ mmHg} \rightarrow 120 \text{ mmHg}$), l'élasticité du Producteur chez les souris hypoxiques tend à retrouver une valeur "normale" de référence, puisqu'elle correspond à celle mesurée dans les coeurs contrôles en normoxie. De plus, étant donné qu'aucune modification de l'élasticité du Consommateur n'est mesurée dans nos expériences (Calmettes et al. 2008; 2010), en conditions d'hypoxie les deux élasticités des coeurs de souris hypoxiques correspondent à celles mesurées sur des coeurs contrôle en conditions d'oxygénation normale (Calmettes et al. 2010).

Or, dans MoCA, ces élasticités nous permettent de calculer les coefficients de contrôle de chacun des modules sur le flux. Ainsi, puisque des élasticités similaires sont mesurées entre des coeurs de souris hypoxiques en conditions d'hypoxie et des coeurs de souris contrôles en conditions normoxiques, une répartition du contrôle identique a été calculée dans ces deux situations (Calmettes et al. 2010). Ce retour du schéma de contrôle sur le flux à son état de référence pour les souris hypoxiques est uniquement expliqué par la modification d'élasticité du Producteur, étant donné qu'aucune modification de l'élasticité du Consommateur n'a été mise en évidence. Ce résultat suggère que l'augmentation d'élasticité du Producteur développée pendant l'acclimatation à l'hypoxie chronique (Calmettes et al. 2008) serait à l'origine

d'une adaptation fonctionnelle de l'ensemble de l'énergétique cardiaque aux nouvelles conditions de fonctionnement (hypoxie) (Calmettes et al. 2010). La conservation d'une répartition "normale" du contrôle semble particulièrement importante pour le fonctionnement de la bioénergétique cardiaque en conditions d'hypoxie aigüe. En effet, contrairement aux coeurs contrôles, aucune modification des paramètres cardiaques (PPF et [PCr]) n'est mesurée pour les coeurs de souris hypoxiques lorsque l'on diminue la concentration en O_2 du milieu (Calmettes et al. 2010). Cette tolérance des souris hypoxiques à la diminution d'oxygène est certainement expliquée par leur schéma de contrôle de référence, qui traduit un fonctionnement "normal" de l'énergétique cardiaque. La répartition du contrôle découlant directement des valeurs d'élasticités ce sont elles qui sont à l'origine de l'adaptation, ce qui montre l'importance de leur détermination dans l'étude de la bioénergétique cardiaque. Dans le coeur de souris hypoxique, l'augmentation d'élasticité du module Producteur pourrait également être le mécanisme à l'origine d'une plus grande résistance de la fonction cardiaque aux conditions d'ischémie (Ostadal and Kolar 2007), résistance manifestée notamment par la diminution des tailles de nécroses (Meerson et al. 1973), la plus grande activité contractile (Tajima et al. 1994), ou encore le développement moindre d'arythmies (Asemu et al. 1999) lors des phases d'ischémie-reperfusion sur des coeurs hypoxiques comparés à des coeurs contrôles.

L'adaptation à l'hypoxie chronique du coeur semble donc impliquer des modifications cinétiques d'une ou de plusieurs composantes du Producteur (qui restent à préciser) permettant l'établissement (ou la conservation) du schéma de contrôle normal du flux énergétique cardiaque. De cette façon, le processus adaptatif consisterait à favoriser le fonctionnement cardiaque (répartition du contrôle entre les modules Producteur et Consommateur) dans un environnement stressant qui implique la diminution de son activité. Une des conséquences semble être l'insensibilité des coeurs hypoxiques à la réduction de la concentration d'oxygène dans le milieu de perfusion, alors que les coeurs contrôles présentent eux une forte diminution non seulement de la concentration en PCr, mais également de la contraction lorsque l'oxygène est diminué (Calmettes et al. 2010).

Dans le système énergétique cardiaque, l'élasticité du module Producteur semble donc très sensible aux conditions dans lesquelles se trouvent le coeur. Cette propriété suggère que les élasticités sont des paramètres déterminants de l'énergétique cardiaque pour répondre à des stress extérieurs et leurs modifications traduisent des changements ayant un retentissement global au niveau de la fonction (propriété émergente). A notre connaissance, outre MoCA, il n'existe aujourd'hui aucune autre approche permettant d'apprécier ce paramètre au niveau intégré de la bioénergétique cardiaque. Il apparaît maintenant crucial de comprendre les processus moléculaires à l'origine des élasticités.

2.1 POURSUITES DIRECTES DE CE TRAVAIL DE THÈSE

Les perspectives directes de ce travail consistent à mieux comprendre les modifications d'élasticité induites par l'hypoxie (aigüe ou chronique).

Tout d'abord, l'hypothèse d'un meilleur couplage miCK-ANT-VDAC développé pendant l'adaptation à l'hypoxie chronique (et pouvant alors expliquer la plus grande sensibilité mitochondriale aux modifications d'intermédiaires énergétiques) doit être étudiée. Ainsi, la comparaison des K_m apparents à l'ADP déterminés sur mitochondries isolées de coeurs de souris contrôle et hypoxiques pourraient par exemple nous renseigner sur la possible implication de l'ANT ([Passarella et al. 1988](#)) dans le processus adaptatif mis en évidence dans nos travaux. Ces expériences sont actuellement en cours au laboratoire, grâce au développement d'une méthodologie spécifique permettant la mesure simultanée des vitesses d'oxydation et de phosphorylation couplée à la détermination des concentrations d'ADP et d'ATP pendant des états stationnaires de phosphorylation sur mitochondries isolées (Gilles Gouspillou - Philippe Diolez, *travaux en cours de publication*).

Un autre moyen possible pour essayer de déterminer le mécanisme à l'origine de la modification d'élasticité après hypoxie chronique serait, en conformité avec la philosophie "Top-Down" ([Brown et al. 1990](#), [Brand 1996; 1998](#)), d'aller étudier plus en détail le module pour lequel l'élasticité est modifiée. Ainsi, dans notre travail, cela consisterait à considérer notre module producteur comme le système d'étude, et à le décomposer à son tour en différents modules. Le système mitochondrial pourrait alors ainsi être étudié plus en détail comme le montrent les travaux antérieurs de l'équipe avec l'application des concepts de l'Analyse du Contrôle Métabolique sur ce système pour étudier les effets de la température ([Dufour et al. 1996](#)), des céramides ([Leducq et al. 2002](#)) ou encore, plus récemment, du vieillissement ([Gouspillou et al. 2010](#)).

De plus, étant donné le rôle crucial du calcium dans la contraction cardiaque, une étude plus poussée sur le lien entre les modifications de l'expression et de l'activité des protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction mises en évidence après hypoxie chronique ([Pei et al. 2003](#)) et la modification d'élasticité mesurée dans nos expériences, serait particulièrement intéressante. La mise au point des techniques

de spectrofluorométrie permettant le suivi de la concentration calcique sur coeur isolé perfusé de souris par des sondes spécifiques (Du et al. 2001a;b, MacGowan et al. 2001) offre une telle perspective.

2.2 PERSPECTIVES GÉNÉRALES

L'apport principal de cette thèse a été la validation de l'approche MoCA sur un modèle de coeur en situation pathologique. Le développement des applications de MoCA aux pathologies et en particulier l'insuffisance cardiaque devrait conduire à la définition de nouvelles stratégies d'interventions thérapeutiques. L'intérêt des approches reposant sur les Théories du Contrôle Métabolique pour la détermination de cibles thérapeutiques n'est en effet plus à démontrer (Cascante et al. 2002). Ainsi, la conséquence logique de notre analyse serait la description qualitative et quantitative des modifications à apporter au système pour retrouver une activité et/ou des intermédiaires énergétiques "normaux", ce qui revient à définir une démarche thérapeutique. Ces informations sont accessibles à la fois par la détermination des élasticités, mais également par l'étude du système avec l'analyse de régulation. De plus, dans l'application de notre approche MoCA, l'utilisation des techniques RMN non traumatiques s'intègre dans les problématiques de ce challenge, puisqu'elle permet même d'envisager des études *in vivo*.

Enfin, étant donné le développement dans cette thèse d'un système spécifique dédié au coeur de souris, MoCA peut désormais être appliquée à tous les modèles transgéniques, ce qui offre de nombreuses perspectives pour la recherche fondamentale et clinique.

Cinquième partie

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

Ackerman, J J and Bore, P J and Gadian, D G and Grove, T H and Radda, G K (1980). NMR studies of metabolism in perfused organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1037) :425–36. (Cité page 63.)

Ainscow, E K and Brand, M D (1999a). Quantifying elasticity analysis : how external effectors cause changes to metabolic systems. *Biosystems*, 49(2) :151–9. (Cité pages 39 et 80.)

Ainscow, E K and Brand, M D (1999b). The responses of rat hepatocytes to glucagon and adrenaline. Application of quantified elasticity analysis. *Eur J Biochem*, 265(3) :1043–55. (Cité pages 39 et 80.)

Appaix, F and Kuznetsov, A V and Usson, Y and Kay, L and Andrienko, T and Olivares, J and Kaambre, T and Sikk, P and Margreiter, R and Saks, V (2003). Possible role of cytoskeleton in intracellular arrangement and regulation of mitochondria. *Exp Physiol*, 88(1) :175–90. (Cité page 42.)

Asemu, G and Papousek, F and Ostádal, B and Kolár, F (1999). Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial K(ATP) channel. *J Mol Cell Cardiol*, 31(10) :1821–31. (Cité pages 111 et 132.)

B

Balaban, R S (1989). Experimental preparations and models for MRS. *Invest Radiol*, 24(12) :948–50. (Cité page 67.)

Balaban, R S (1990). Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol*, 258(3 Pt 1) :C377–89. (Cité pages 21, 22, 27 et 128.)

Balaban, R S (2009). The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11) :1334–41. (Cité page 27.)

Balaban, R S and Heineman, F W (1989). Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. *Mol Cell Biochem*, 89(2) :191–7. (Cité pages 43 et 128.)

- Barr, R L and Lopaschuk, G D** (2000). Methodology for measuring in vitro/ex vivo cardiac energy metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 43(2) :141–52. (Cité page 67.)
- Barrie, S E and Harris, P** (1976). Effects of chronic hypoxia and dietary restriction on myocardial enzyme activities. *Am J Physiol*, 231(4) :1308–13. (Cité page 52.)
- Bassingthwaite, J and Hunter, P and Noble, D** (2009). The Cardiac Physiome : perspectives for the future. *Exp Physiol*, 94(5) :597–605. (Cité page 32.)
- Beard, D A** (2006). Modeling of oxygen transport and cellular energetics explains observations on in vivo cardiac energy metabolism. *PLoS Comput Biol*, 2(9) :e107. (Cité page 41.)
- Bers, D M** (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868) :198–205. (Cité pages 21 et 79.)
- Bert, P** (1878). *La pression barométrique - Recherches de Physiologie Expérimentale*. Paris G. Masson. (Cité page 13.)
- Bing, R J and Fenton, J C** (1965). Cardiac Metabolism. *Annu Rev Med*, 16 :1–2. (Cité page 17.)
- Bishop, S P and Altschuld, R A** (1970). Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am J Physiol*, 218(1) :153–9. (Cité page 24.)
- Bittl, J A and Ingwall, J S** (1985). Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A ³¹P NMR magnetization transfer study. *J Biol Chem*, 260(6) :3512–7. (Cité page 20.)
- Blyth, KG and Peacock, A J** (2009). Imaging the right ventricle in pulmonary hypertension. *PVRI Review*, 1 :180–5. (Cité page 16.)
- Borutaite, V and Mildaziene, V and Ivanoviene, L and Kholodenko, B and Toleikis, A and Praskevicius, A** (1989). The role of long-chain acyl-CoA in the damage of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *FEBS Lett*, 243(2) :264–6. (Cité page 22.)
- Boutilier, R G and St-Pierre, J** (2000). Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 126(4) :481–90. (Cité page 26.)
- Brand, M D** (1996). Top down metabolic control analysis. *J Theor Biol*, 182(3) :351–60. (Cité pages 34, 35 et 133.)
- Brand, M D** (1997). Regulation analysis of energy metabolism. *J Exp Biol*, 200(Pt 2) :193–202. (Cité pages 39 et 130.)

- Brand, M D** (1998). Top-down elasticity analysis and its application to energy metabolism in isolated mitochondria and intact cells. *Mol Cell Biochem*, 184(1-2) :13–20. (Cité pages 32, 35 et 133.)
- Brand, M D and Chien, L F and Diolez, P** (1994). Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochem J*, 297 (Pt 1) :27–9. (Cité page 19.)
- Brand, M D and Curtis, R K** (2002). Simplifying metabolic complexity. *Biochem Soc Trans*, 30(2) :25–30. (Cité pages 40 et 45.)
- Brand, M D and Esteves, T C** (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, 2(2) :85–93. (Cité page 23.)
- Braunwald, E and Rutherford, J D** (1986). Reversible ischemic left ventricular dysfunction : evidence for the "hibernating myocardium". *J Am Coll Cardiol*, 8(6) :1467–70. (Cité page 25.)
- Brimioulle, S and LeJeune, P and Naeije, R** (1996). Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. *J Appl Physiol*, 81(4) :1535–43. (Cité page 14.)
- Brown, G C and Hafner, R P and Brand, M D** (1990). A 'top-down' approach to the determination of control coefficients in metabolic control theory. *Eur J Biochem*, 188(2) :321–5. (Cité pages 34, 38 et 133.)
- Budinger, G R and Duranteau, J and Chandel, N S and Schumacker, P T** (1998). Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes. Role of mitochondria as the O₂ sensor. *J Biol Chem*, 273(6) :3320–6. (Cité pages 25 et 26.)
- Buttgereit, F and Brand, M D** (1995). A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J*, 312 (Pt 1) :163–7. (Cité pages 25 et 26.)

C

- Calmettes, G and Deschodt-Arsac, V and Gouspillou, G and Miraux, S and Muller, B and Franconi, JM and Thiaudiere, E and Diolez, P** (2010). Improved energy supply regulation in chronic hypoxic mouse counteracts hypoxia-induced altered cardiac energetics. *PLoS One*, 5(2) :e9306. (Cité pages 60, 80, 113, 128, 129, 130, 131 et 132.)
- Calmettes, G and Deschodt-Arsac, V and Thiaudiere, E and Muller, B and Diolez, P** (2008). Modular control analysis of effects of chronic hypoxia on mouse heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(6) :R1891–7. (Cité pages 79, 80, 102, 111, 126, 127, 128, 129, 130 et 131.)

- Cascante, M and Boros, L G and Comin-Anduix, B and de Atauri, P and Centelles, J J and Lee, P WN** (2002). Metabolic control analysis in drug discovery and disease. *Nat Biotechnol*, 20(3) :243–9. (Cité pages 32 et 134.)
- Cascante, M and Marin, S** (2008). Metabolomics and fluxomics approaches. *Essays Biochem*, 45 :67–81. (Cité page 32.)
- Cazorla, O and Aït Mou, Y and Goret, L and Vassort, G and Dauzat, M and Lacampagne, A and Tanguy, S and Obert, P** (2006). Effects of high-altitude exercise training on contractile function of rat skinned cardiomyocyte. *Cardiovasc Res*, 71(4) :652–60. (Cité page 129.)
- Chatham, J and Gilbert, H F and Radda, G K** (1988). Inhibition of glucose phosphorylation by fatty acids in the perfused rat heart. *FEBS Lett*, 238(2) :445–9. (Cité page 80.)
- Chen, S J and Chen, Y F and Meng, Q C and Durand, J and Dicarlo, V S and Oparil, S** (1995). Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*, 79(6) :2122–31. (Cité page 15.)
- Christian, B and El Alaoui-Talibi, Z and Moravec, M and Moravec, J** (1998). Palmitate oxidation by the mitochondria from volume-overloaded rat hearts. *Mol Cell Biochem*, 180(1-2) :117–28. (Cité page 24.)
- Clyne, C A and Alpert, J S and Benotti, J R** (1989). Interdependence of the left and right ventricles in health and disease. *Am Heart J*, 117(6) :1366–73. (Cité page 16.)
- Cohen, S M** (1987). Physiological NMR Spectroscopy : From Isolated Cells to Man. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 508 :1–537. (Cité page 63.)
- Cortassa, S and Aon, M A and Marbán, E and Winslow, R L and O'Rourke, B** (2003). An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys J*, 84(4) :2734–55. (Cité pages 22 et 27.)

D

- Daneshrad, Z and Garcia-Riera, M P and Verdys, M and Rossi, A** (2000). Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. *Mol Cell Biochem*, 210(1-2) :159–66. (Cité pages 24 et 52.)
- Daneshrad, Z and Novel-Chaté, V and Birot, O and Serrurier, B and Sanchez, H and Bigard, A X and Rossi, A** (2001). Diet restriction plays an important role in the alterations of heart mitochondrial function following exposure of young rats to chronic hypoxia. *Pflugers Arch*, 442(1) :12–8. (Cité page 52.)

- Delannoy, E and Courtois, A and Freund-Michel, V and Leblais, V and Marthan, R and Muller, B** (2010). Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries : role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res*, 85(3) :582–92. (Cité page 127.)
- Denton, R M and McCormack, J G and Edgell, N J** (1980). Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na⁺, Mg²⁺ and ruthenium red on the Ca²⁺-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria. *Biochem J*, 190(1) :107–17. (Cité page 22.)
- Denton, R M and Richards, D A and Chin, J G** (1978). Calcium ions and the regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J*, 176(3) :899–906. (Cité page 22.)
- Dhalla, N S and Elimban, V and Rupp, H** (1992). Paradoxical role of lipid metabolism in heart function and dysfunction. *Mol Cell Biochem*, 116(1-2) :3–9. (Cité page 22.)
- Diolez, P and Deschodt-Arsac, V and Raffard, G and Simon, C and Dos Santos, P and Thiaudière, E and Arsac, L and Franconi, JM** (2007). Modular regulation analysis of heart contraction : application to in situ demonstration of a direct mitochondrial activation by calcium in beating heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293(1) :R13–9. (Cité pages 22, 27, 28, 39, 40, 45, 57, 68, 75, 77, 80, 101, 125, 126 et 128.)
- Diolez, P and Kessler, A and Haraux, F and Valerio, M and Brinkmann, K and Brand, M D** (1993). Regulation of oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Biochem Soc Trans*, 21 (Pt 3)(3) :769–73. (Cité page 32.)
- Diolez, P and Raffard, G and Simon, C and Leducq, N and Dos Santos, P and Canioni, P** (2002). Mitochondria do not control heart bioenergetics. *Mol Biol Rep*, 29(1-2) :193–6. (Cité pages 27, 28, 39, 45, 57, 75, 77, 101 et 125.)
- Do, E and Baudet, S and Verdys, M and Touzeau, C and Bailly, F and Lucas-Héron, B and Sagniez, M and Rossi, A and Noireaud, J** (1997). Energy metabolism in normal and hypertrophied right ventricle of the ferret heart. *J Mol Cell Cardiol*, 29(7) :1903–13. (Cité page 128.)
- Dos Santos, P and Aliev, M K and Diolez, P and Duclos, F and Besse, P and Bonoron-Adèle, S and Sikk, P and Canioni, P and Saks, V A** (2000). Metabolic control of contractile performance in isolated perfused rat heart. Analysis of experimental data by reaction :diffusion mathematical model. *J Mol Cell Cardiol*, 32(9) :1703–34. (Cité pages 57 et 68.)

Du, C and MacGowan, G A and Farkas, D L and Koretsky, A P (2001a). Calcium measurements in perfused mouse heart : quantitating fluorescence and absorbance of Rhod-2 by application of photon migration theory. *Biophys J*, 80(1) :549–61. (Cité page 134.)

Du, C and MacGowan, G A and Farkas, D L and Koretsky, A P (2001b). Calibration of the calcium dissociation constant of Rhod(2)in the perfused mouse heart using manganese quenching. *Cell Calcium*, 29(4) :217–27. (Cité page 134.)

Dufour, S and Rouse, N and Canioni, P and Diolez, P (1996). Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation. *Biochem J*, 314 (Pt 3) :743–51. (Cité page 133.)

E

Essop, M F (2007). Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol*, 584(Pt 3) :715–26. (Cité pages 23, 45, 111 et 127.)

F

Fell, D A (1992). Metabolic control analysis : a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem J*, 286 (Pt 2) :313–30. (Cité page 35.)

Field, M L and Clark, J F and Henderson, C and Seymour, A M and Radda, G K (1994). Alterations in the myocardial creatine kinase system during chronic anaemic hypoxia. *Cardiovasc Res*, 28(1) :86–91. (Cité pages 23 et 130.)

Fossel, E T and Morgan, H E and Ingwall, J S (1980). Measurement of changes in high-energy phosphates in the cardiac cycle using gated ³¹P nuclear magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(6) :3654–8. (Cité page 43.)

Fulton, R M and Hutchinson, E C and Jones, A M (1952). Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J*, 14(3) :413–20. (Cité page 53.)

G

Gadian, D G and Radda, G K (1981). NMR studies of tissue metabolism. *Annu Rev Biochem*, 50 :69–83. (Cité page 63.)

Gibbs, J S R (2007). Biventricular function at high altitude : implications for regulation of stroke volume in chronic hypoxia. *Adv Exp Med Biol*, 618 :13–24. (Cité page 127.)

Gnaiger, E (2001). Bioenergetics at low oxygen : dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol*, 128(3) :277–97. (Cité pages 13, 22 et 25.)

- Gnaiger, E and Steinlechner-Maran, R and Méndez, G and Eberl, T and Margreiter, R** (1995). Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr*, 27(6) :583–96. (Cité pages 13 et 25.)
- Gospillou, G and Bourdel-Marchasson, I and Rouland, R and Calmettes, G and Franconi, JM and Deschodt-Arsac, V and Diolez, P** (2010). Alteration of mitochondrial oxidative phosphorylation in aged skeletal muscle involves modification of adenine nucleotide translocator. *Biochim Biophys Acta*, 1797(2) :143–51. (Cité pages 32 et 133.)
- Griffiths, E J and Rutter, G A** (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, 1787(11) :1324–33. (Cité page 27.)
- Grist, T M and Kneeland, J B and Rilling, W R and Jesmanowicz, A and Francisz, W and Hyde, J S** (1989). Gated cardiac MR imaging and P-31 MR spectroscopy in humans at 1.5 T. Work in progress. *Radiology*, 170(2) :357–61. (Cité page 43.)
- Guenard, H** (2001). Physiologie Humaine (3ème Edition). *Editions Pradel*. (Cité page 14.)

H

- Hafner, R P and Brown, G C and Brand, M D** (1990). Analysis of the control of respiration rate, phosphorylation rate, proton leak rate and protonmotive force in isolated mitochondria using the 'top-down' approach of metabolic control theory. *Eur J Biochem*, 188(2) :313–9. (Cité page 32.)
- Hall, A E and Hutter, O F and Noble, D** (1963). Current-voltage relations of Purkinje fibres in sodium-deficient solutions. *J Physiol*, 166 :225–40. (Cité page 31.)
- Heinrich, R and Rapoport, T A** (1974). A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur J Biochem*, 42(1) :89–95. (Cité pages 32, 37 et 38.)
- Herrmann, G R and Wilson, F N** (1922). Ventricular Hypertrophy. A Comparison of Electrocardiographic and Postmorum Observations. *Heart*, ix :91–147. (Cité page 53.)
- Heusch, G and Schulz, R** (1996). Hibernating myocardium : a review. *J Mol Cell Cardiol*, 28(12) :2359–72. (Cité page 25.)
- Hochachka, P W** (1986). Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 231(4735) :234–41. (Cité page 26.)

- Hochachka, P W and Buck, L T and Doll, C J and Land, S C** (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance : molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18) :9493–8. (Cité page 26.)
- Holloszy, J O and Oscai, L B and Don, I J and Molé, P A** (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes : adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 40(6) :1368–73. (Cité page 83.)
- Horn, M** (2006). Cardiac magnetic resonance spectroscopy : a window for studying physiology. *Methods Mol Med*, 124 :225–48. (Cité page 67.)
- Hornberg, J J and Bruggeman, F J and Bakker, B M and Westerhoff, H V** (2007). Metabolic control analysis to identify optimal drug targets. *Prog Drug Res*, 64 :171, 173–89. (Cité page 32.)
- Hoyer, K and Krenz, M and Robbins, J and Ingwall, J S** (2007). Shifts in the myosin heavy chain isozymes in the mouse heart result in increased energy efficiency. *J Mol Cell Cardiol*, 42(1) :214–21. (Cité page 26.)
- Hunter, P and Robbins, P and Noble, D** (2002). The IUPS human Physiome Project. *Pflugers Arch*, 445(1) :1–9. (Cité page 31.)
- Hütter, J F and Alves, C and Soboll, S** (1990). Effects of hypoxia and fatty acids on the distribution of metabolites in rat heart. *Biochim Biophys Acta*, 1016(2) :244–52. (Cité page 22.)
- Hutter, O F and Noble, D** (1960). Rectifying properties of heart muscle. *Nature*, 188 :495. (Cité page 31.)

I

- Illing, B and Horn, M and Urban, B and Strömer, H and Schnackerz, K and de Groot, M and Haase, A and Hu, K and Ertl, G and Neubauer, S** (1998). Changes of myocardial high-energy phosphates with the cardiac cycle during acute or chronic myocardial stress. *Magn Reson Med*, 40(5) :727–32. (Cité page 43.)
- Ingwall, J S and Weiss, R G** (2004). Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res*, 95(2) :135–45. (Cité pages 17, 25, 26 et 40.)
- Itoh, A and Tomita, H and Sano, S** (2009). Doppler echocardiographic assessment of left ventricular diastolic function in chronic hypoxic rats. *Acta Med Okayama*, 63(2) :87–96. (Cité page 127.)

J

- Jacobus, W E and Lehninger, A L** (1973). Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem*, 248(13) :4803–10. (Cité page 19.)
- Jardin, F** (2003). Ventricular interdependence : how does it impact on hemodynamic evaluation in clinical practice ? *Intensive Care Med*, 29(3) :361–3. (Cité page 16.)
- Jeneson, J A and Westerhoff, H V and Kushmerick, M J** (2000). A metabolic control analysis of kinetic controls in ATP free energy metabolism in contracting skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(3) :C813–32. (Cité page 41.)
- Jeneson, J A and Wiseman, R W and Westerhoff, H V and Kushmerick, M J** (1996). The signal transduction function for oxidative phosphorylation is at least second order in ADP. *J Biol Chem*, 271(45) :27995–8. (Cité page 41.)
- Joost, H G and Thorens, B** (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators : nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, 18(4) :247–56. (Cité page 18.)

K

- Kacser, H and Burns, J A** (1973). The control of flux. *Symp Soc Exp Biol*, 27 :65–104. (Cité pages 32, 37 et 38.)
- Kammermeier, H** (1994). Isolated, (Langendorff) hearts perfused with an aqueous buffer (should) have excess oxygen availability. *Basic Res Cardiol*, 89(6) :545–8. (Cité page 60.)
- Kammermeier, H and Schmidt, P and Jüngling, E** (1982). Free energy change of ATP-hydrolysis : a causal factor of early hypoxic failure of the myocardium ? *J Mol Cell Cardiol*, 14(5) :267–77. (Cité pages 25 et 26.)
- Kessler, A and Diolez, P and Brinkmann, K and Brand, M D** (1992). Characterisation of the control of respiration in potato tuber mitochondria using the top-down approach of metabolic control analysis. *Eur J Biochem*, 210(3) :775–84. (Cité page 32.)
- Kitano, H** (2002). Systems biology : a brief overview. *Science*, 295(5560) :1662–4. (Cité page 31.)
- Korvald, C and Elvenes, O P and Myrnes, T** (2000). Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(4) :H1345–51. (Cité page 24.)
- Korzeniewski, B** (2007). Regulation of oxidative phosphorylation through parallel activation. *Biophys Chem*, 129(2-3) :93–110. (Cité page 41.)

- Korzeniewski, B and Deschodt-Arsac, V and Calmettes, G and Franconi, JM and Diolez, P** (2008). Physiological heart activation by adrenaline involves parallel activation of ATP usage and supply. *Biochem J*, 413(2) :343–347. (Cité page 57.)
- Korzeniewski, B and Deschodt-Arsac, V and Calmettes, G and Gouspillou, G and Franconi, JM and Diolez, P** (2009a). Effect of pyruvate, lactate and insulin on ATP supply and demand in unpaced perfused rat heart. *Biochem J*, 423(3) :421–428. (Cité page 57.)
- Korzeniewski, B and Deschodt-Arsac, V and Calmettes, G and Gouspillou, G and Franconi, JM and Diolez, P** (2009b). Effect of pyruvate, lactate and insulin on ATP supply and demand in unpaced perfused rat heart. *Biochem J*, 423(3) :421–8. (Cité page 125.)
- Kushmerick, M J and Conley, K E** (2002). Energetics of muscle contraction : the whole is less than the sum of its parts. *Biochem Soc Trans*, 30(2) :227–31. (Cité page 41.)
- Kusuoka, H and Inoue, M and Tsuneoka, Y and Watari, H and Hori, M and Abe, H** (1985). Augmented energy consumption during early systole as a mechanism of cyclical changes in high-energy phosphates in myocardium assessed by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Jpn Circ J*, 49(10) :1099–107. (Cité page 43.)

L

- Langendorff, O** (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen (Étude sur préparation vivante de coeur de mammifère). *Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere, Bonn*, 61 :291–332. (Cité page 55.)
- Leblais, V and Delannoy, E and Fresquet, F and Bégueret, H and Bellance, N and Banquet, S and Allières, C and Leroux, L and Desgranges, C and Gadeau, A and Muller, B** (2008). beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries : preservation of the endothelial nitric oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*, 77(1) :202–10. (Cité page 127.)
- Leducq, N and Macouillard-Pouletier de Gannes, F and Rotureau, MA and Belloc, F and Voisin, P and Canioni, P and Diolez, P** (2002). Top down analysis ceramide-induced mitochondrial dysfunctions : role of mitochondrial swelling. *Mol Biol Rep*, 29(1-2) :47–50. (Cité pages 32 et 133.)
- Leggewie, G and Kolbe, A and Lemoine, R and Roessner, U and Lytovchenko, A and Zuther, E and Kehr, J and Frommer, W B and Riesmeier, J W and Willmitzer, L and Fernie, A R** (2003). Overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato results in alterations in leaf carbon partitioning and in tuber metabolism but has little impact on tuber morphology. *Planta*, 217(1) :158–67. (Cité page 33.)

Leverve, X (1998). Metabolic and nutritional consequences of chronic hypoxia. *Clin Nutr*, 17(6) :241–51. (Cité page 24.)

Louie, E K and Rich, S and Brundage, B H (1986). Doppler echocardiographic assessment of impaired left ventricular filling in patients with right ventricular pressure overload due to primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 8(6) :1298–306. (Cité page 16.)

M

MacGowan, G A and Du, C and Glonty, V and Suhan, J P and Koretsky, A P and Farkas, D L (2001). Rhod-2 based measurements of intracellular calcium in the perfused mouse heart : cellular and subcellular localization and response to positive inotropy. *J Biomed Opt*, 6(1) :23–30. (Cité page 134.)

Marban, E (1991). Myocardial stunning and hibernation. The physiology behind the colloquialisms. *Circulation*, 83(2) :681–8. (Cité pages 25 et 26.)

Marcus, J T and Vonk Noordegraaf, A and Roeleveld, R J and Postmus, P E and Heethaar, R M and Van Rossum, A C and Boonstra, A (2001). Impaired left ventricular filling due to right ventricular pressure overload in primary pulmonary hypertension : noninvasive monitoring using MRI. *Chest*, 119(6) :1761–5. (Cité page 16.)

McCormack, J G and Denton, R M (1979). The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J*, 180(3) :533–44. (Cité page 22.)

McFarland, E W and Kushmerick, M J and Moerland, T S (1994). Activity of creatine kinase in a contracting mammalian muscle of uniform fiber type. *Biophys J*, 67(5) :1912–24. (Cité pages 41 et 42.)

McGarry, J D and Brown, N F (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, 244(1) :1–14. (Cité page 18.)

Meerson, F Z and Gomzakov, O A and Shimkovich, M V (1973). Adaptation to high altitude hypoxia as a factor preventing development of myocardial ischemic necrosis. *Am J Cardiol*, 31(1) :30–4. (Cité pages 111 et 132.)

Meyer, R A and Sweeney, H L and Kushmerick, M J (1984). A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am J Physiol*, 246(5 Pt 1) :C365–77. (Cité pages 19 et 41.)

Mik, E G and Ince, C and Eerbeek, O and Heinen, A and Stap, J and Hooibrink, B and Schumacher, C A and Balestra, G M and Johannes, T and Beek, J F and Nieuwenhuis, A F and van Horssen, P and Spaan, J A and Zuurbier, C J (2009).

Mitochondrial oxygen tension within the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 46(6) :943–51. (Cité pages 13 et 60.)

Miroux, S and Calmettes, G and Massot, P and Lefrancois, W and Parzy, E and Muller, B and Arsac, LM and Deschodt-Arsac, V and Franconi, JM and Diolez, P and Thiaudiere, E (2009). 4D retrospective black blood trueFISP imaging of mouse heart. *Magn Reson Med*. (Cité pages 53, 79, 92, 101 et 127.)

Mitchell, P (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191 :144–8. (Cité page 18.)

N

Nascimben, L and Ingwall, J S and Pauletto, P and Friedrich, J and Gwathmey, J K and Saks, V and Pessina, A C and Allen, P D (1996). Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation*, 94(8) :1894–901. (Cité page 42.)

Nelson, L (2006). Acute cyanide toxicity : mechanisms and manifestations. *J Emerg Nurs*, 32(4 Suppl) :S8–11. (Cité page 80.)

Neubauer, S (1998). Influence of left ventricular pressures and heart rate on myocardial high-energy phosphate metabolism. *Basic Res Cardiol*, 93 Suppl 1 :102–7. (Cité page 43.)

Noble, D (2002). Modeling the heart—from genes to cells to the whole organ. *Science*, 295(5560) :1678–82. (Cité page 32.)

Noble, D (2003). The future : putting Humpty-Dumpty together again. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 1) :156–8. (Cité page 45.)

Noble, D (2006). Systems biology and the heart. *Biosystems*, 83(2-3) :75–80. (Cité page 32.)

Nouette-Gaulain, K and Malgat, M and Rocher, C and Savineau, JP and Marthan, R and Mazat, JP and Sztark, F (2005). Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res*, 66(1) :132–40. (Cité pages 23, 24, 128 et 129.)

Novel-Chaté, V and Aussedat, J and Saks, V A and Rossi, A (1995). Adaptation to chronic hypoxia alters cardiac metabolic response to beta stimulation : novel face of phosphocreatine overshoot phenomenon. *J Mol Cell Cardiol*, 27(8) :1679–87. (Cité pages 23, 128 et 130.)

Novel-Chaté, V and Mateo, P and Saks, V A and Hoerter, J A and Rossi, A (1998). Chronic exposure of rats to hypoxic environment alters the mechanism of energy

transfer in myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 30(7) :1295–303. (Cité pages 23, 24, 128 et 130.)

O

Ostadal, B and Kolar, F (2007). Cardiac adaptation to chronic high-altitude hypoxia : beneficial and adverse effects. *Respir Physiol Neurobiol*, 158(2-3) :224–36. (Cité pages 23, 45, 111, 127, 130 et 132.)

P

Passarella, S and Ostuni, A and Atlante, A and Quagliariello, E (1988). Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun*, 156(2) :978–86. (Cité page 133.)

Pei, J M and Kravtsov, G M and Wu, S and Das, R and Fung, M L and Wong, T M (2003). Calcium homeostasis in rat cardiomyocytes during chronic hypoxia : a time course study. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(6) :C1420–8. (Cité pages 27, 128, 129, 130 et 133.)

Pei, J M and Zhou, J J and Bian, J S and Yu, X C and Fung, M L and Wong, T M (2000). Impaired $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i responses to kappa-opioid receptor stimulation in the heart of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(5) :C1483–94. (Cité page 27.)

Pessin, J E and Bell, G I (1992). Mammalian facilitative glucose transporter family : structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol*, 54 :911–30. (Cité page 18.)

Pissarek, M and Bigard, X and Mateo, P and Guezennec, C Y and Hoerter, J A (1997). Adaptation of cardiac myosin and creatine kinase to chronic hypoxia : role of anorexia and hypertension. *Am J Physiol*, 272(4 Pt 2) :H1690–5. (Cité pages 23, 24, 26 et 130.)

Poizat, C and Keriél, C and Cuchet, P (1994). Is oxygen supply sufficient to induce normoxic conditions in isolated rat heart? *Basic Res Cardiol*, 89(6) :535–44. (Cité page 60.)

Pugh, C W and Ratcliffe, P J (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia : role of the HIF system. *Nat Med*, 9(6) :677–84. (Cité page 24.)

Q

Quant, P A (1993). Experimental application of top-down control analysis to metabolic systems. *Trends Biochem Sci*, 18(1) :26–30. (Cité page 32.)

Quant, P A and Makins, R A (1994). Metabolic control analysis of hepatic beta-oxidation : the top-down approach. *Biochem Soc Trans*, 22(2) :441–6. (Cité page 32.)

Quant, P A and Robin, D and Robin, P and Girard, J and Brand, M D (1993). A top-down control analysis in isolated rat liver mitochondria : can the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA pathway be rate-controlling for ketogenesis? *Biochim Biophys Acta*, 1156(2) :135–43. (Cité page 32.)

R

Reboul, C and Tanguy, S and Juan, J M and Dauzat, M and Obert, P (2005). Cardiac remodeling and functional adaptations consecutive to altitude training in rats : implications for sea level aerobic performance. *J Appl Physiol*, 98(1) :83–92. (Cité page 127.)

Reimer, K A and Jennings, R B (1986). Myocardial ischemia, hypoxia, and infarction. *The Heart and Cardiovascular System, New York Raven Press*, 53 :1133–1201. (Cité pages 1, 22 et 25.)

Rolfe, D F and Brown, G C (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*, 77(3) :731–58. (Cité pages 17 et 22.)

Rossi, A and Lortet, S (1996). Energy metabolism patterns in mammalian myocardium adapted to chronic physiopathological conditions. *Cardiovasc Res*, 31(1) :163–71. (Cité pages 23 et 128.)

Rumsey, W L and Abbott, B and Bertelsen, D and Mallamaci, M and Hagan, K and Nelson, D and Erecinska, M (1999). Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol*, 276(1 Pt 2) :H71–80. (Cité page 24.)

S

Saks, V and Dzeja, P and Schlattner, U and Vendelin, M and Terzic, A and Wallimann, T (2006). Cardiac system bioenergetics : metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*, 571(Pt 2) :253–73. (Cité page 79.)

Saks, V A and Aliev, M K (1996). Is there the creatine kinase equilibrium in working heart cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 227(2) :360–7. (Cité page 42.)

Schlattner, U and Dolder, M and Wallimann, T and Tokarska-Schlattner, M (2001). Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem*, 276(51) :48027–30. (Cité page 130.)

- Schwarz, E R and Schoendube, F A and Kostin, S and Schmiedtke, N and Schulz, G and Buell, U and Messmer, B J and Morrison, J and Hanrath, P and vom Dahl, J** (1998). Prolonged myocardial hibernation exacerbates cardiomyocyte degeneration and impairs recovery of function after revascularization. *J Am Coll Cardiol*, 31(5) :1018–26. (Cité page 25.)
- Sivitz, W I and Lund, D D and Yorek, B and Grover-McKay, M and Schmid, P G** (1992). Pretranslational regulation of two cardiac glucose transporters in rats exposed to hypobaric hypoxia. *Am J Physiol*, 263(3 Pt 1) :E562–9. (Cité page 24.)
- Spindler, M and Illing, B and Horn, M and de Groot, M and Ertl, G and Neubauer, S** (2001). Temporal fluctuations of myocardial high-energy phosphate metabolite with the cardiac cycle. *Basic Res Cardiol*, 96(6) :553–6. (Cité page 43.)
- Spindler, M and Saupe, K W and Tian, R and Ahmed, S and Matlib, M A and Ingwall, J S** (1999). Altered creatine kinase enzyme kinetics in diabetic cardiomyopathy. A(31)P NMR magnetization transfer study of the intact beating rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 31(12) :2175–89. (Cité page 42.)
- Srere, P A** (1969). [1] Citrate Synthase : [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods in Enzymology*, 13 :3–11. (Cité page 85.)
- Strange, K** (2005). The end of "naive reductionism" : rise of systems biology or renaissance of physiology? *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(5) :C968–74. (Cité page 45.)
- Sutherland, F J and Shattock, M J and Baker, K E and Hearse, D J** (2003). Mouse isolated perfused heart : characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(11) :867–78. (Cité pages 59, 125 et 126.)

T

- Tajima, M and Katayose, D and Bessho, M and Isoyama, S** (1994). Acute ischaemic preconditioning and chronic hypoxia independently increase myocardial tolerance to ischaemia. *Cardiovasc Res*, 28(3) :312–9. (Cité pages 111 et 132.)
- Tanaka, K and Honda, H and Akita, N** (1992). A gating ³¹P NMR method triggered by pulses for cardiac pacing. *NMR Biomed*, 5(6) :329–34. (Cité page 43.)
- ten Hove, M and Neubauer, S** (2008). The application of NMR spectroscopy for the study of heart failure. *Curr Pharm Des*, 14(18) :1787–97. (Cité page 67.)
- Toyo-oka, T and Nagayama, K and Umeda, M and Eguchi, K and Hosoda, S** (1986). Rhythmic change of myocardial phosphate metabolite content in cardiac cycle observed by depth-selected and EKG-gated in vivo ³¹P-NMR spectroscopy in a whole animal. *Biochem Biophys Res Commun*, 135(3) :808–15. (Cité page 43.)

V

- van Bilsen, M and Smeets, P J H and Gilde, A J and van der Vusse, G J** (2004). Metabolic remodelling of the failing heart : the cardiac burn-out syndrome ? *Cardiovasc Res*, 61(2) :218–26. (Cité page 24.)
- Vendelin, M and Kongas, O and Saks, V** (2000). Regulation of mitochondrial respiration in heart cells analyzed by reaction-diffusion model of energy transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(4) :C747–64. (Cité page 42.)
- Vleugels, A and Vereecke, J and Carmeliet, E** (1980). Ionic currents during hypoxia in voltage-clamped cat ventricular muscle. *Circ Res*, 47(4) :501–8. (Cité page 27.)
- Von Euler, U S and Liljestrand, G** (1946). Observations on the pulmonary arterial blood pressure of the cat. *Acta Physiol Scand*, 12 :301–320. (Cité page 14.)

W

- Wallimann, T and Wyss, M and Brdiczka, D and Nicolay, K and Eppenberger, H M** (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands : the 'phospho-creatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J*, 281 (Pt 1) :21–40. (Cité pages 19 et 20.)
- Weir, E K and Archer, S L** (1995). The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction : the tale of two channels. *FASEB J*, 9(2) :183–9. (Cité page 15.)
- Weiss, J N and Yang, L and Qu, Z** (2006). Systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders : network perspectives of cardiovascular metabolism. *J Lipid Res*, 47(11) :2355–66. (Cité pages 31, 40 et 45.)
- Westerhoff, H V and Kolodkin, A and Conradie, R and Wilkinson, S J and Bruggeman, F J and Krab, K and van Schuppen, J H and Hardin, H and Bakker, B M and Moné, M J and Rybakova, K N and Eijken, M and van Leeuwen, H J P and Snoep, J L** (2009). Systems biology towards life in silico : mathematics of the control of living cells. *J Math Biol*, 58(1-2) :7–34. (Cité page 31.)
- Wiggers, H and Noreng, M and Paulsen, P K and Böttcher, M and Egeblad, H and Nielsen, T T and Bøtker, H E** (2001). Energy stores and metabolites in chronic reversibly and irreversibly dysfunctional myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol*, 37(1) :100–8. (Cité page 25.)
- Wikman-Coffelt, J and Sievers, R and Coffelt, R J and Parmley, W W** (1983). The cardiac cycle : regulation and energy oscillations. *Am J Physiol*, 245(2) :H354–62. (Cité page 43.)

Wright, G and Higgin, J J and Raines, R T and Steenbergen, C and Murphy, E (2003). Activation of the prolyl hydroxylase oxygen-sensor results in induction of GLUT₁, heme oxygenase-1, and nitric-oxide synthase proteins and confers protection from metabolic inhibition to cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 278(22) :20235–9. (Cité page 24.)

Wu, F and Zhang, E Y and Zhang, J and Bache, R J and Beard, D A (2008). Phosphate metabolite concentrations and ATP hydrolysis potential in normal and ischaemic hearts. *J Physiol*, 586(Pt 17) :4193–208. (Cité page 41.)

Y

Ytrehus, K (2000). The ischemic heart—experimental models. *Pharmacol Res*, 42(3) :193–203. (Cité page 125.)

Z

Zungu, M and Alcolea, M P and García-Palmer, F J and Young, M E and Essop, M F (2007). Genomic modulation of mitochondrial respiratory genes in the hypertrophied heart reflects adaptive changes in mitochondrial and contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(5) :H2819–25. (Cité pages 23 et 127.)

Zungu, M and Young, M E and Stanley, W C and Essop, M F (2008). Expression of mitochondrial regulatory genes parallels respiratory capacity and contractile function in a rat model of hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Mol Cell Biochem*, 318(1-2) :175–81. (Cité pages 23, 127 et 128.)

Titre Analyse Intégrative de l'Adaptation de l'Énergétique Cardiaque à l'Hypoxie Chronique

Résumé La compréhension des mécanismes physiologiques mis en jeu en réponse à l'hypoxie aiguë et chronique ainsi que leur retentissement global sur l'énergétique cardiaque nécessite l'application d'approches globales. L'approche intégrative développée par notre équipe, l'Analyse Modulaire du Contrôle (MoCA) permet une description quantitative de l'ensemble des interactions au sein d'un système biologique complexe décomposé en différents modules liés par des intermédiaires communs, ce qui en fait un outil puissant pour l'étude des interactions au sein de l'énergétique cardiaque, normale ou pathologique. Dans cette thèse, MoCA a été appliquée sur des coeurs isolés de souris contrôles et de souris soumises à une hypoxie chronique de 21 jours, perfusés en conditions d'oxygénation normale ou avec un milieu dont la concentration en oxygène dans le milieu a été réduite. Après exposition à l'hypoxie chronique, les coeurs sont caractérisés par une réponse (élasticité) plus importante des processus d'apport en énergie face à une variation des intermédiaires énergétiques (PCr, ATP, Pi), et ceci malgré une diminution de la masse mitochondriale. De plus, contrairement aux coeurs sains, aucune modification de l'activité contractile et de la concentration d'intermédiaires énergétiques n'a été mesurée sur les coeurs hypoxiques après diminution de la concentration en oxygène dans le milieu de perfusion. Ces résultats suggèrent une adaptation fonctionnelle de l'ensemble de la bioénergétique cardiaque après exposition à l'hypoxie chronique, l'augmentation de l'élasticité des processus d'apport en énergie permettant de compenser en partie les altérations énergétiques induites par un déficit en oxygène.

Mots-clés Analyse Modulaire du Contrôle, Énergétique Cardiaque, Hypoxie Chronique, Adaptation

Title System's Biology Analysis of Chronic Hypoxia-Induced Heart Energetics Adaptation

Abstract An important issue in the comprehension of the link between molecular events developed in pathologies such as chronic hypoxia adaptation, is the development of new experimental strategies aimed at the study of the integrated organ physiology. Our Modular Control Analysis (MoCA), gives quantitative information on the internal control and regulation of integrated heart energetics on the basis of a supply-demand system and is therefore of particular interest to better understand the overall effect as well as the relative importance of the various modifications developed during pathologies. In this thesis, MoCA was applied on isolated hearts of control and chronic hypoxic mice perfused with high or low oxygen in the medium. Despite a severe mitochondrial alteration after chronic hypoxia exposure, a surprising higher response of energy supply (elasticity) to energetic intermediates changes (PCr, ATP, Pi) was detected in chronic hypoxic hearts. Moreover, chronic hypoxic hearts energetics was unchanged by oxygen reduction while a strong concomitant decrease in heart contractile activity and in PCr concentration, was measured in control hearts. As suggested by these results, this increase in energy-supply elasticity could be considered as an adaptive mechanism developed after chronic hypoxia counteracting hypoxia-induced altered cardiac energetics.

Keywords System's Biology, Cardiac Energetics, Chronic Hypoxia, Adaptation
