



**HAL**  
open science

# Implication de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) dans le mécanisme du préconditionnement anesthésique par le Sévoflurane vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique

Sébastien Pommier

► **To cite this version:**

Sébastien Pommier. Implication de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) dans le mécanisme du préconditionnement anesthésique par le Sévoflurane vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique. Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-01005378

**HAL Id: dumas-01005378**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01005378>**

Submitted on 12 Jun 2014

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

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

Université de Nice-Sophia Antipolis  
Faculté de médecine de Nice - CHU Nice

**THESE D'EXERCICE DE MEDECINE**

En vue de l'obtention du  
**Diplôme d'état de docteur en médecine**

Présenté par Sébastien POMMIER

**Implication de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)  
dans le mécanisme du préconditionnement anesthésique  
par le Sévoflurane vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion  
myocardique**

Soutenue le 29 octobre 2013 à 18h00

Amphithéâtre 1 René BOURGEON - Faculté de médecine - Nice

Membres du jury :

Pr Marc RAUCOULES-AIMÉ

Président

Pr Jacques LEVRAUT

Assesseur

Dr Jean-Ehrland RICCI

Assesseur

Pr Michel CARLES

Directeur de thèse



Université de Nice-Sophia Antipolis  
Faculté de médecine de Nice - CHU Nice

**THESE D'EXERCICE DE MEDECINE**

En vue de l'obtention du  
**Diplôme d'état de docteur en médecine**

Présenté par Sébastien POMMIER

**Implication de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)  
dans le mécanisme du préconditionnement anesthésique  
par le Sévoflurane vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion  
myocardique**

Soutenue le 29 octobre 2013 à 18h00

Amphithéâtre 1 René BOURGEON - Faculté de médecine - Nice

Membres du jury :

Pr Marc RAUCOULES-AIMÉ

Président

Pr Jacques LEVRAUT

Assesseur

Dr Jean-Ehrland RICCI

Assesseur

Pr Michel CARLES

Directeur de thèse

## UNIVERSITÉ DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS

**FACULTÉ DE MÉDECINE**

Liste des professeurs au **1er septembre 2013** à la Faculté de Médecine de Nice

<b>Doyen</b>	M. BAQUÉ Patrick
<b>Assesseurs</b>	M. BOILEAU Pascal M. HÉBUTERNE Xavier M. LEVRAUT Jacques
<b>Conservateur de la bibliothèque</b>	M. SCALABRE Grégory
<b>Chef des services administratifs</b>	Mme CALLEA Isabelle
<b>Doyens Honoraires</b>	M. AYRAUD Noël M. RAMPAL Patrick M. BENCHIMOL Daniel

**Professeurs Honoraires**

M. BALAS Daniel	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BLAIVE Bruno	M. LAPALUS Philippe
M. BOQUET Patrice	M. LAZDUNSKI Michel
M. BOURGEON André	M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. BOUTTÉ Patrick	M. LE BAS Pierre
M. BRUNETON Jean-Noël	M. LE FICHOUX Yves
Mme BUSSIERE Françoise	M. LOUBIERE Robert
M. CHATEL Marcel	M. MARIANI Roger
M. COUSSEMENT Alain	M. MASSEYEFF René
M. DARCOURT Guy	M. MATTEI Mathieu
M. DELMONT Jean	M. MOUIEL Jean
M. DEMARD François	Mme MYQUEL Martine
M. DOLISI Claude	M. OLLIER Amédée
M. FREYCHET Pierre	M. ORTONNE Jean-Paul
M. GÉRARD Jean-Pierre	M. SCHNEIDER Maurice
M. GILLET Jean-Yves	M. SERRES Jean-Jacques
M. GRELLIER Patrick	M. TOUBOL Jacques
M. HARTER Michel	M. TRAN Dinh Khiem
M. INGLESAKIS Jean-André	M. ZIEGLER Gérard
M. LALANNE Claude-Michel	

**M.C.A. Honoraire**

Mlle ALLINE Madeleine

**M.C.U. Honoraires**

M. ARNOLD Jacques  
 M. BASTERIS Bernard  
 Mlle CHICHMANIAN RoseMarie  
 M. EMILIOZZI Roméo  
 M. GASTAUD Marcel  
 M. GIRARD-PIPAU Fernand  
 M. GIUDICELLI Jean  
 M. MAGNÉ Jacques  
 Mme MEMRAN Nadine  
 M. MENGUAL Raymond  
 M. POIRÉE Jean-Claude  
 Mme ROURE Marie-Claire

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

M.	AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M.	BENCHIMOL Daniel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	CAMOUS Jean-Pierre	Thérapeutique (48.04)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	DELLAMONICA Pierre	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M.	DESNUELLE Claude	Biologie Cellulaire (44.03)
Mme	EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M.	FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction
(54.05)		
M.	FRANCO Alain	Gériatrie et Biologie du vieillissement (53.01)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GASTAUD Pierre	Ophthalmologie (55.02)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GRIMAUD Dominique	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
Mme	LEBRETON Élisabeth	Chirurgie Plastique, Reconstructrice et Esthétique
(50.04)		
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	PRINGUEY Dominique	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	VAN OBBERGHEN Emmanuel	Biochimie et Biologie Moléculaire (44.01)

**PROFESSEURS PREMIERE CLASSE**

M.	BATT Michel	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)

M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	CRENESSE Dominique	Physiologie (44.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

#### PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

M.	ALBERTINI Marc	Pédiatrie (54.01)
Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mlle	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CANIVET Bertrand	Médecine Interne (53.01)
M.	CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M.	CASSUTO Jill-Patrice	Hématologie et Transfusion (47.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	DUMONTIER Christian	Chirurgie plastique
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
M.	FREDENRICH Alexandre	Endocrinologie, Diabète et Maladies métaboliques
	(54.04)	
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	JOURDAN Jacques	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50-03)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)

M. PRADIER Christian (46.01)	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention
M. ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M. RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
M. SADOUL Jean-Louis (54.04)	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques
M. STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M. THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M. TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M. VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

#### PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M. SAUTRON Jean-Baptiste	Médecine Générale
--------------------------	-------------------

#### MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ALUNNI-PERRET Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M. AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M. BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
Mme BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. DELOTTE Jérôme	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M. DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme DONZEAU Michèle (54.05)	Biologie du Développement et de la Reproduction
M. FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M. FRANKEN Philippe	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M. GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
Mlle LANDRAUD Luce	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M. NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
M. PHILIP Patrick	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
Mlle PULCINI Céline	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M. ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)
M. TESTA Jean (46.01)	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention
M. TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)



**PROFESSEURS ASSOCIÉS**

M.	DIOMANDE Mohenou Isidore	Anatomie et Cytologie Pathologiques
M.	HOFLIGER Philippe	Médecine Générale
M.	MAKRIS Démosthènes	Pneumologie
M.	PITTET Jean-François	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
Mme	POURRAT Isabelle	Médecine Générale

**MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

Mme	CHATTI Kaouthar	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	GARDON Gilles	Médecine Générale
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine Générale
M.	PAPA Michel	Médecine Générale

**PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ**

M.	BERTRAND François	Médecine Interne
M.	BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M.	CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme	FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M.	MAGNÉ Jacques	Biophysique
M.	QUARANTA Jean-François	Santé Publique

## REMERCIEMENTS

---

*Je remercie très sincèrement*

*Mr le Professeur Marc RAUCOULES-AIMÉ*

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

*Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale - CHU de Nice.*

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider ma thèse.*

*Mr le Professeur Jacques LEVRAUT,*

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

*Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale - CHU de Nice.*

*Vous m'avez gentiment accordé de votre temps pour faire partie de mon jury. J'en suis honoré. J'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de travailler ensemble tant sur le plan clinique que scientifique.*

*Monsieur le Docteur Jean-Ehrland RICCI,*

*Docteur des Sciences de la Vie et de la Santé*

*Laboratoire de recherche C3M Inserm U1065 – Nice*

*Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Durant ces deux dernières années à ton contact et celui de ton équipe, J'ai pu découvrir l'univers de la recherche fondamentale. Tu m'as permis d'acquérir une excellente formation dans le domaine des sciences de la vie et de la santé, ainsi qu'une rigueur de travail et une gestion des échéances (je te promets d'essayer de me comporter comme un scientifique et non comme un médecin... c'est mal parti).*

*Monsieur le Professeur Michel CARLES,*

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

*Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale - CHU de Nice.*

*Je te remercie, tout d'abord, d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse. Ta philosophie et ta conception du travail d'anesthésiste-réanimateur sont pour moi une référence. Tu m'as apporté énormément sur le plan clinique, sur le plan universitaire, sur le plan de la recherche fondamentale et clinique, et sur le plan relationnel avec mes collègues et les patients. Je ne te remercierai jamais assez pour ton investissement à mon égard et pour les moyens que tu mets à ma disposition pour que nous réussissions nos projets. Je suis très heureux que nos chemins se soient croisés et j'espère sincèrement que nous continuerons à travailler ensemble encore longtemps. Merci également pour ton amitié et tous les moments extraprofessionnels que nous partageons (je ne parle pas que du ragraage ou de la montée du Mont-Chaube by night).*

*Je remercie tous les médecins anesthésistes-réanimateurs qui ont contribué à ma formation clinique, aussi bien du CHU de Nice, que du CHI de Fréjus St Raphael, du CHPF de Polynésie Française et du CHU Henri Mondor. Je remercie plus particulièrement les docteurs Emma HOFLIGER et Mike BLAY pour leur investissement clinique qui m'a permis de poursuivre pleinement mes travaux de recherche fondamentale au laboratoire (sur le bloc infrapiriforme et ses secrets...).*

*Je remercie l'ensemble des chercheurs, post-doctorants et doctorants du laboratoire C3M Inserm U1065 pour leur pédagogie, leur patience et leur soutien durant ces dernières années. Je remercie plus particulièrement les membres de l'équipe 3, Marie BENETEAU, Marie JACQUIN, Johanna CHICHE, Laura MONDRAGON-MARTINEZ, Barbara ZUNINO et Ophélie MEYNET pour leur aide et pour tout ce qu'ils m'ont appris (et je m'excuse pour mes obsessions de propreté).*

*Je remercie affectueusement ma famille, mon père, ma mère, mes frères Laurent et Brice, ma belle-mère Isabel et mes grands-parents, pour leur investissement, leur soutien, leur encouragement et leur patience tout au long de mes études. Merci d'avoir toujours cru en moi.*

*Je remercie mes amis proches pour le bonheur qu'ils m'apportent. Je pense à Toto, Rafou, Befu, Héloïse, Jaco et Jeannot pour nos soirées parisiennes, lyonnaises, bruxelloises et corses (allez mon ptit !), sans oublier le BORNARD et le KAIDO pour nos « exploits » sportifs toujours aussi fous (Sandenay!). Je pense aussi à tous ceux qui sont présents dans mon quotidien, mes beaux-parents Maurice et Manette, Michel et Françoise, Sylviane et Corinne (attention je risque de m'habituer à toutes vos attentions...).*

*Je remercie de tout mon cœur, ma femme Magali, pour tout le bonheur qu'elle me donne, pour tous les merveilleux moments que nous passons, pour tous les projets que nous avons et pour sa patience (qui au dire de certain, est digne d'une sainte). Je te remercie, mon amour, pour le magnifique cadeau que tu portes... un mini-Pommier...(Ça promet !)*

# SOMMAIRE

---

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTES DES FIGURES &amp; TABLEAU – PRE-REQUIS.....</b>	<b>16</b>
<b>LISTES DES FIGURES &amp; TABLEAU – ETUDE.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
<b>PRE-REQUIS .....</b>	<b>20</b>
I. L'ISCHEMIE-REPERFUSION.....	21
A. Généralités.....	21
B. Ischémie.....	21
C. Reperfusion.....	23
D. Ischémie-reperfusion en anesthésie.....	24
II. LE METABOLISME ENERGETIQUE DES CARDIOMYOCYTES.....	25
A. Généralités.....	25
B. Glycolyse.....	26
C. Fermentation lactique.....	26
D. Phosphorylation oxydative (OXPHOS).....	27
E. $\beta$ -oxydation des acides gras.....	28
III. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ROS).....	29
A. Généralités.....	29
B. Production des ROS.....	29
C. Système anti-oxydant.....	30
D. Lésions induites par le stress oxydant.....	31
E. Rôle ambivalent des ROS.....	32
IV. LA MORT CELLULAIRE.....	33
A. Généralités.....	33
B. Apoptose.....	33
1. Voie extrinsèque de l'apoptose.....	34
2. Voie intrinsèque de l'apoptose.....	34
3. Caspases.....	36
C. Mort indépendante des caspases.....	37
1. Nécrose et Nécroptose.....	37
2. Autophagie.....	38
3. CICD.....	38

V.	LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2.....	39
A.	<i>Généralités</i> .....	39
B.	<i>Activation Bax-Bak</i> .....	39
C.	<i>Apoptosome</i> .....	40
D.	<i>Régulation des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques</i> .....	40
VI.	LES MOYENS DE PROTECTION VIS-A-VIS DE L'IR.....	42
A.	<i>Généralités</i> .....	42
B.	<i>Préconditionnement</i> .....	43
1.	Préconditionnement ischémiq (IPC).....	43
2.	Préconditionnement anesthésique (APC).....	43
3.	Mécanisme de l'IPC et de l'APC.....	45
VII.	L'AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE (AMPK).....	47
A.	<i>Généralités</i> .....	47
B.	<i>Structure et régulation de l'AMPK</i> .....	47
C.	<i>Fonction de l'AMPK</i> .....	48
D.	<i>Activateurs et inhibiteurs de l'AMPK</i> .....	49
	<b>ETUDE.....</b>	<b>50</b>
	<b>OBJECTIFS &amp; PLAN DE L'ETUDE.....</b>	<b>51</b>
I.	OBJECTIF DE L'ETUDE.....	51
II.	PLAN DE L'ETUDE.....	51
	<b>MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>52</b>
I.	PRODUITS.....	52
II.	CULTURE CELLULAIRE.....	52
III.	SIMULATION DES LESIONS D'IR MYOCARDIQUE.....	52
IV.	PRECONDITIONNEMENT ANESTHESIQUE.....	54
V.	FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE.....	55
VI.	EXTRACTION PROTEIQUE TOTALE.....	55
VII.	DOSAGE DE L'ACTIVITE CASPASE 3.....	55
VIII.	WESTERN BLOT.....	56
IX.	MESURE DE LA MASSE MITOCHONDRIALE.....	56
X.	ANTICORPS UTILISES EN WESTERN BLOT.....	57
XI.	ANALYSE STATISTIQUE.....	57
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>58</b>
I.	MISE AU POINT DU MODELE D'IR ET APC.....	58

II. ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'AMPK PAR LE SEVOFLURANE DE MANIERE ROS DEPENDANTE.....	60
A. <i>Le Sévoflurane active l'AMPK par phosphorylation.....</i>	60
B. <i>L'activation de l'AMPK par le Sévoflurane est dépendant des ROS.....</i>	60
III. BCL-XL COMME EFFECTEUR POTENTIEL DE L'EFFET PROTECTEUR DU SEVOFLURANE.....	62
A. <i>L'APC permet de limiter l'apoptose induite par l'IR.....</i>	62
B. <i>L'APC par le Sévoflurane induit une expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL ....</i>	62
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>69</b>
<b>SERMENT D'HIPPOCRATE.....</b>	<b>78</b>

## ABREVIATIONS

---

ACC	Acétyl-CoA Carboxylase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AG	Acide Gras
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
Apaf-1	Apoptotic Protease-Activating Factor-1
APC	Préconditionnement Anesthésique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-TriPhosphate
Bak	Bcl-2 Antagonist Killer 1
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2	B-cell CLL / Lymphoma-2
Bcl-xL	Bcl-2-related gene long isoform
CaMKK $\beta$	Calcium/calmoduline-dependant protein Kinase Kinase 2
Canaux mitoK <sub>ATP</sub>	Canaux potassiques mitochondriaux ATP-sensible
CEC	Circulation ExtraCorporelle
CICD	Mort indépendante des caspases
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECT	Chaîne de transport d'électron
FBS	Sérum de veau foetal
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'hydrogène
HIF1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factors 1 alpha
IAP	Inhibiteur des protéines apoptotiques
IC ou IntraC	Intraconditionnement anesthésique
IPC	Préconditionnement ischémique
IR	Ischémie-Reperfusion
IVA	Artère InterVentriculaire Antérieure
LDH	Lactate DésHydrogénase
LKB1	Liver Kinase B1
MnTBAP	Chlorure de Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphrin
MOMP	Perméabilisation de la membrane mitochondriale externe
MPG	2-MercaptoPropionyl Glycine
MPTP	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NCX	Echangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B
NHE	Echangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>

O <sub>2</sub>	Oxygène
O <sub>2</sub> <sup>°-</sup>	Anion superoxyde
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFK	PhosphoFructoKinase
PKC	Protéine Kinase C
PKC $\delta$	Protéine Kinase C, isoforme delta
PréC	Préconditionnement anesthésique
Redox	Oxydo-réduction
ReOx	Réoxygénation
RNS	Espèces réactive de l'azote
RONs	Espèces réactives oxygène-azotées
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
Sévo	Sévoflurane
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SOD	Superoxydes dismutases
TAK1	Transforming growth factor $\beta$ Activated Kinase 1



## LISTES DES FIGURES & TABLEAU – PRE-REQUIS

---

Figure 1 : Représentation des lésions induites par l'ischémie et la reperfusion .....	22
Figure 2 : Représentation du métabolisme glucidique .....	25
Figure 3 : Représentation de la fermentation lactique .....	27
Figure 4 : Représentation de la chaîne de transport d'électron mitochondriale .....	28
Figure 5 : Caractérisation des ros et du système anti-oxydant .....	32
Figure 6 : Représentation de l'apoptose .....	35
Figure 7 : Caractérisation morphologique de l'apoptose et de la nécrose .....	37
Figure 8 : Représentation des membres de la famille bcl-2 .....	41
Figure 9 : APC diminue la libération de la troponine post-opératoire dans les suites d'une chirurgie cardiaque à cœur arrêté .....	44
Figure 10 : Implication des ros dans le mécanisme de l'APC .....	45
Figure 11 : Fonction de l'AMPK .....	49
&	
Tableau 1 : l'APC diminue la libération de la troponine post-opératoire dans les suites d'une chirurgie cardiaque à cœur arrêté .....	44

## LISTES DES FIGURES & TABLEAU – ETUDE

---

Figure 1 : Description du protocole expérimental d'ischémie-reperfusion .....	53
Figure 2 : Description du protocole expérimental d'exposition au sévoflurane mise au point par Zitta .....	54
Figure 3 : APC par le sévoflurane protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire par apoptose en situation d'IR .....	59
Figure 4 : Sévoflurane induit une activation de la voie de l'AMPK de manière ROS-dépendante....	61
Figure 5 : Bcl-xL, induit par le sévoflurane, est un potentiel effecteur de l'effet anti-apoptotique de l'APC .....	63
Figure 6 : Conclusion .....	68
&	
Tableau 1 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les western blots .....	57

## INTRODUCTION

---

## INTRODUCTION

---

L'ischémie-reperfusion (IR) myocardique est un phénomène bien connu responsable de la première cause de morbi-mortalité péri-opératoire en chirurgie cardiaque et non cardiaque <sup>1</sup>. L'étude et la compréhension de ses mécanismes lésionnels sont d'un intérêt majeur afin de prévenir et limiter les lésions induites par l'IR.

Parmi les moyens de protection connus, le préconditionnement ischémique (IPC) découvert en 1986 par Murry et Jennings <sup>2</sup> a longtemps été considéré comme l'unique méthode de cardioprotection vis-à-vis de l'IR. L'IPC était alors réalisée par de brèves séquences d'IR réalisées avant une occlusion coronaire prolongée, suivie d'une reperfusion. Expérimentalement, le préconditionnement ischémique est le phénomène connu le plus puissant pour limiter la taille de l'infarctus du myocarde et ses effets bénéfiques ont été largement reproduits aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Malheureusement, les applications cliniques de l'IPC ne sont pas sans danger et ne sont pas toujours réalisables.

Pour cela, des méthodes de préconditionnement pharmacologique ont été recherchées, telle que le préconditionnement anesthésique (APC) par les agents anesthésiques volatiles de la famille des éthers halogénés (halothane, enflurane, isoflurane, sévoflurane et desflurane) rapporté la première fois par Bland et Lowenstein <sup>3</sup> en 1976. Depuis la publication de cet article référence, de très nombreuses études ont fait la preuve de l'effet cardioprotecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR myocardique tant chez l'animal <sup>4 5 6 7 8</sup> que chez l'homme <sup>9 10 11 12 13 14 15 16 17 18</sup>.

Les mécanismes responsables de la protection myocardique par les agents anesthésiques ressemblent partiellement à ceux impliqués dans l'IPC. La plupart de ces mécanismes ont été largement étudié expérimentalement dans des modèles animaux. L'activité des récepteurs couplés aux protéines G, la fonction des canaux ioniques, les kinases de signalisation intracellulaire, la régulation de l'apoptose, la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ROS) et de l'azote (Reactive Nitrogen Species RNS), l'expression génique et la physiologie mitochondriale ont montré jouer un rôle important dans l'effet protecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR myocardique.

En l'état actuel des connaissances, aucun mécanisme décrit ne fait consensus en dehors du rôle des ROS qui se comporteraient comme des initiateurs des voies de signalisation et des effecteurs intracellulaires responsables de l'effet cardioprotecteur de l'APC par les agents anesthésiques volatiles <sup>19 20 21 22 23 24 25</sup>.

Les données actuelles suggèrent que les agents anesthésiques sont capables d'induire plusieurs voies de signalisation et plusieurs effecteurs intracellulaires dont l'effet global est cardioprotecteur de manière synergique.

Parmi les voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'APC, la voie de signalisation de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) est une hypothèse reposant sur son rôle connu : l'AMPK est une enzyme cruciale jouant un rôle de senseur métabolique dans le métabolisme énergétique cellulaire, en régulant toutes les fonctions vitales de la cellule (métabolisme glucidique, lipidique, protéique, prolifération, croissance et mort cellulaire) en situation de stress énergétique (hypoxie, déprivation en glucose, ischémie, exercice)<sup>26</sup>. Néanmoins, à ce jour, son implication dans les mécanismes de l'APC n'a pas été évaluée.

Parmi les agents volatiles, le sévoflurane est l'halogéné le plus étudié pour ses propriétés préconditionnantes en clinique humaine. Son effet préventif vis-à-vis des conséquences de l'IR myocardique a été particulièrement documenté<sup>9 10 11 12 13 15 16</sup>.

L'hypothèse de notre travail repose sur l'implication de la voie de signalisation de l'AMPK dans l'APC par le sévoflurane, de manière ROS dépendante.

## PRE-REQUIS

---

## PRE-REQUIS

---

### I. L'ischémie-reperfusion

#### A. Généralités

L'ischémie-reperfusion (IR) fait partie, avec l'inflammation, des 2 grands mécanismes lésionnels physiopathologiques observés en anesthésie et en réanimation. Elle est rencontrée dans diverses pathologies aiguës et intéresse divers organes. Parmi celles-ci, on retrouve l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes crâniens, les insuffisances circulatoires aiguës, les arrêts cardio-circulatoires... Ce phénomène d'ischémie-reperfusion est également très fréquent en chirurgie programmée, en rapport avec des techniques chirurgicales nécessitant des clampages artériels, comme la chirurgie cardiaque à cœur arrêté, la chirurgie vasculaire, la transplantation d'organe, mais aussi la chirurgie de membre réalisée sous garrot pneumatique.

Donc la compréhension des mécanismes lésionnels et protecteurs de l'ischémie-reperfusion est d'un intérêt majeur et quotidien pour les médecins, notamment anesthésiste-réanimateurs.

Sur le plan physiopathologique, l'ischémie-reperfusion est composée de 2 phases successives et distinctes : l'ischémie puis la reperfusion <sup>27</sup>.

#### B. Ischémie

La première phase, l'ischémie, est définie par une diminution de l'apport en sang artériel d'un tissu ou d'un organe. Ceci est donc responsable d'une baisse de l'oxygénation, appelée hypoxie (faible niveau d'oxygène) puis anoxie (absence d'oxygène), associée à une suppression des apports en substrats énergétiques (glucose, lactate, pyruvate, acides gras, glycérol, acides aminés) et une altération de l'homéostasie électrolytique (calcium, potassium, proton). L'ensemble de ces privations conduit à une altération voire un arrêt du fonctionnement du tissu et de l'organe.

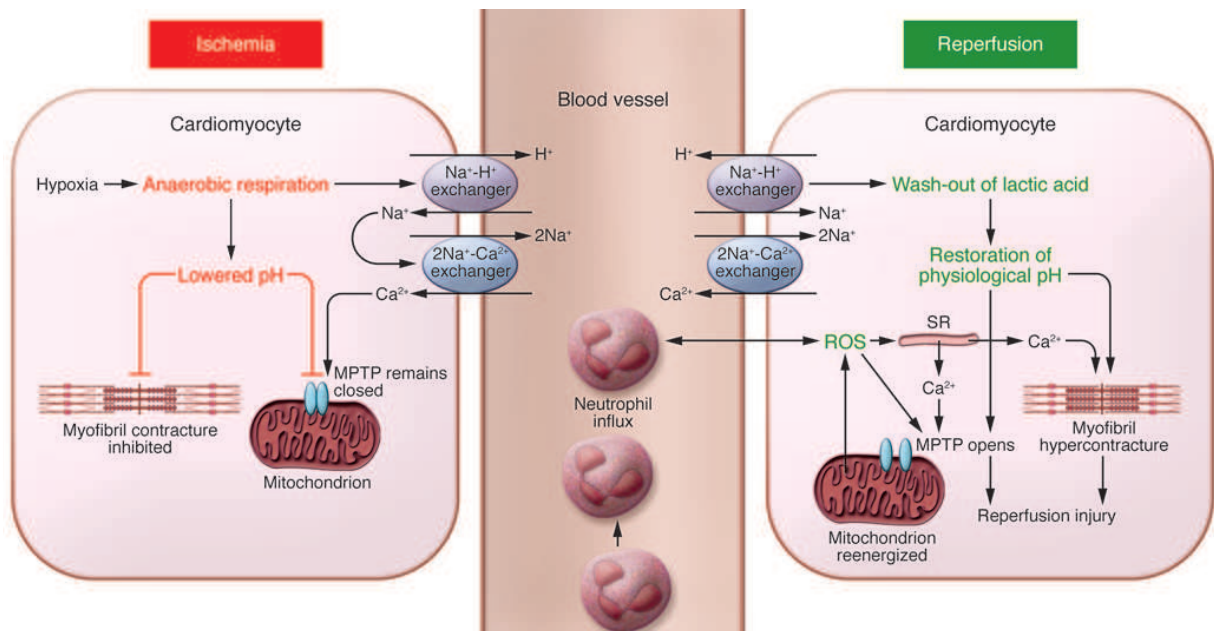
L'arrêt du débit sanguin artériel, responsable de l'ischémie, peut être secondaire à diverses étiologies. Les causes les plus fréquemment retrouvées sont soit une obstruction directe de la lumière de l'artère par un thrombus (appelé thrombose ou embolie), soit une compression extrinsèque de l'artère (garrot pneumatique, clampage artériel chirurgical, tumeur...) ou soit par une baisse ou un arrêt du débit cardiaque (insuffisance circulatoire aiguë, arrêt cardio-circulatoire).

A l'échelle cellulaire, les cardiomyocytes nécessitent une importante production d'ATP pour maintenir l'homéostasie cellulaire et permettre l'activité contractile. Cette production d'énergie est assurée principalement par la phosphorylation oxydative (OXPHOS) dont le fonctionnement est dépendant de la présence d'oxygène.

En situation d'ischémie, dès les premières minutes, l'absence d'apport en oxygène a pour conséquence un arrêt de l'OXPHOS. La glycolyse devient alors la principale source de production d'ATP. Malheureusement, cette voie énergétique est peu rentable et rapidement épuisable après consommation des réserves de glycogène intracellulaire responsable d'une déplétion profonde en ATP. La glycolyse est suivie par la fermentation lactique qui conduit à la production d'acide lactique entraînant une surcharge cellulaire en proton.

Afin de limiter l'acidose intracellulaire, les protons sont expulsés hors de la cellule par l'intermédiaire des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) entraînant une surcharge sodique<sup>28</sup>. Compte-tenu de la déplétion en ATP, les pompes ioniques  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-dépendantes sont déficientes et les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) assurent l'expulsion du sodium au prix d'une surcharge calcique intracellulaire.

Au final, l'ensemble de ces troubles métaboliques intracellulaires (chute ATP + acidose + surcharge calcique) induit un arrêt de l'activité contractile myocardique, une ouverture du pore de transition mitochondriale (MPTP) et une initiation de la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Figure 1)<sup>29 30 31 32</sup>.



**Figure 1 : REPRESENTATION DES LESIONS INDUITES PAR L'ISCHEMIE ET LA REPERFUSION (Hausenloy et al, JCI, 2013)<sup>31</sup>**

### C. Reperfusion

La seconde phase, la reperfusion, est définie par une restauration de l'apport en sang artériel d'un tissu après la phase d'ischémie. Ceci est donc responsable d'un rétablissement de l'oxygénation « normale » du tissu mais aussi des apports en substrats énergétiques et de l'homéostasie électrolytique.

Malheureusement, la restauration complète des apports physiologiques chez des cellules qui se sont adaptées au métabolisme en anaérobie, engendre des lésions propres, dites de reperfusion.

La reperfusion survient le plus souvent après une intervention médicale entraînant une désobstruction de l'artère (thrombolyse, angioplastie endoluminale, pontage vasculaire, déclampage artériel) ou par la normalisation du débit cardiaque (reprise d'une activité circulatoire après un arrêt cardiaque).

A l'échelle cellulaire, la réintroduction brutale d'oxygène induit une reprise du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale qui a été endommagé lors de l'ischémie (notamment par la fuite du cytochrome c). Les réactions d'oxydo-réduction sont alors incomplètes au sein de la chaîne du transport d'électron aboutissant à une production massive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au lieu de la production d'ATP. Selon le niveau de production de ROS, le système anti-oxydant peut être dépassé empêchant alors la neutralisation des ROS excédentaires.

Parallèlement, la réactivation des pompes ioniques ATP-dépendantes permet une correction rapide du pH intracellulaire par expulsion des protons, au prix d'une surcharge calcique persistante <sup>28</sup>.

L'ensemble de ces troubles métaboliques (excès ROS + surcharge calcique) induit une hypercontracture myocardique (sidération myocardique) et un stress oxydant. Le stress oxydant engendre alors des lésions propres dites de reperfusion pouvant conduire à la mort cellulaire par apoptose (Figure 1) <sup>30 31 32</sup>.

A l'échelle d'un organe, on observe des lésions d'ischémie-reperfusion hétérogènes. Au sein d'une zone globale de souffrance, appelée aire à risque (AAR : area at risk), on retrouve donc des cellules en nécrose, en nécroptose ou en apoptose selon leur degré de vascularisation de suppléance résiduelle.

De plus, l'inflammation induite par l'ischémie-reperfusion participe à l'aggravation des lésions notamment lors de la reperfusion <sup>33</sup>.

Au final, l'ensemble des lésions d'ischémie puis de reperfusion altère le métabolisme cellulaire et induit la mort cellulaire par nécrose ou apoptose, qui représentent le stade ultime du phénomène d'ischémie-reperfusion. A l'échelle



d'un organe, la mort de groupes cellulaires forme l'infarctissement tissulaire, appelé l'infarctus.

#### D. Ischémie-reperfusion en anesthésie

Le phénomène d'ischémie-reperfusion, notamment myocardique, représente la première cause de mortalité péri-opératoire en chirurgie programmée non cardiaque<sup>1</sup>. Le vieillissement de la population et la forte prévalence des maladies cardio-vasculaires participent à l'incidence croissante des patients à risque cardio-vasculaire élevé, rencontrés en chirurgie. Ceci explique l'intérêt majeur de la prise en charge spécifique de ces patients et la nécessité du développement de moyens de protection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion.

Par ailleurs, certaines techniques chirurgicales nécessitent l'exclusion vasculaire d'un organe ou d'un territoire pour permettre la réalisation de l'acte chirurgical. C'est notamment le cas en chirurgie cardiaque à cœur arrêté pour la réparation ou le remplacement valvulaire. Cet acte chirurgical nécessite un arrêt temporaire des battements cardiaques et une ouverture-vidange des cavités cardiaques. Pour ce faire, il est mis en place une circulation extra-corporelle (CEC) afin d'assurer la perfusion de l'organisme, et un clampage aortique pour exclure le cœur. Après clampage aortique, l'arrêt cardiaque est obtenu par une injection intra-coronaire d'un liquide de cardioplégie froid riche en potassium permettant un arrêt cardiaque en phase de relaxation. A l'issue de l'acte chirurgical, l'activité cardiaque est rétablie et le clampage aortique est levé pour permettre la reprise de l'activité circulatoire spontanée du patient, sous couvert d'une assistance par une CEC.

Ainsi, la chirurgie cardiaque à cœur arrêté représente un véritable modèle d'ischémie-reperfusion myocardique clinique avec une phase d'ischémie lors du clampage aortique suivie d'une phase de reperfusion lors du déclampage aortique.

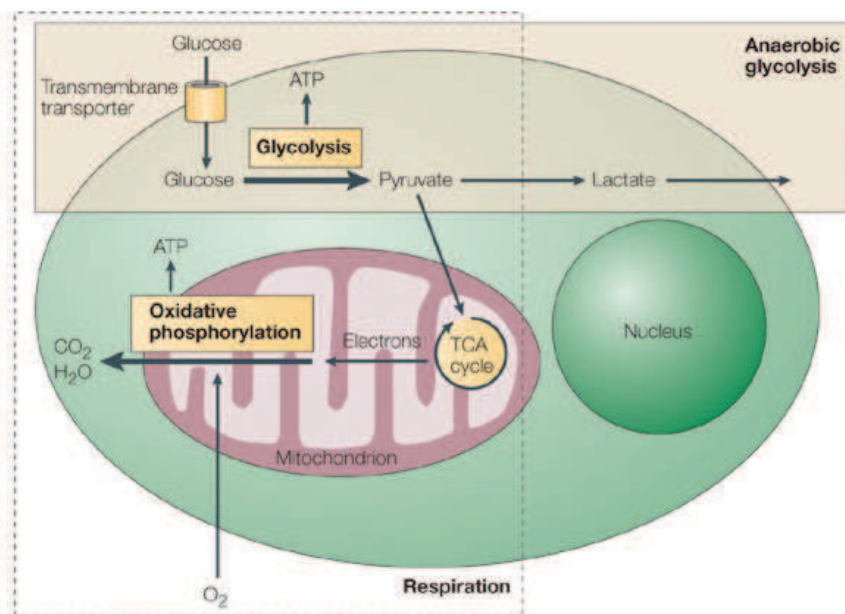
## II. Le métabolisme énergétique des cardiomyocytes

### A. Généralités

Le métabolisme énergétique cellulaire est défini par l'ensemble des réactions chimiques intracellulaires permettant la production d'énergie chimique (ATP) directement utilisable par la cellule. Ces réactions sont toutes des réactions d'oxydoréduction au cours desquelles les nutriments (sources d'énergie prélevées dans le milieu extracellulaire) sont oxydés. Ces oxydations cataboliques conduisent d'une part à la production de coenzymes réduits ( $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ) dont l'oxydation permanente est indispensable pour la pérennité du système et d'autre part à la production d'ATP dont l'hydrolyse libère l'énergie nécessaire aux réactions chimiques.

Dans les cellules cardiaques, la production d'ATP et la réduction des co-enzymes ( $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ) sont assurées par 3 voies métaboliques : la glycolyse, la bêta-oxydation et la phosphorylation oxydative (Figure 2).

Il existe d'autres voies métaboliques mineures permettant la production d'ATP et la réduction des co-enzymes : la voie des pentoses phosphates et l'oxydation des acides aminés (glutamine, glycine, aspartate...) que nous n'aborderons pas ici.



**Figure 2 : REPRESENTATION DU METABOLISME GLUCIDIQUE**

Le métabolisme glucidique comporte un segment commun, la glycolyse qui transforme une mole de glucose en 2 moles de pyruvate avec la production de 2 moles d'ATP. Selon les conditions d'oxygénation, le pyruvate est soit fermenté en lactate, processus appelé fermentation lactique (glycolyse anaérobie), ou soit transformé en acétyl-CoA pour être incorporé au cycle de Krebs (TCA) dans la mitochondrie et permettre la production de 34 moles d'ATP par la phosphorylation oxydative.

## B. Glycolyse

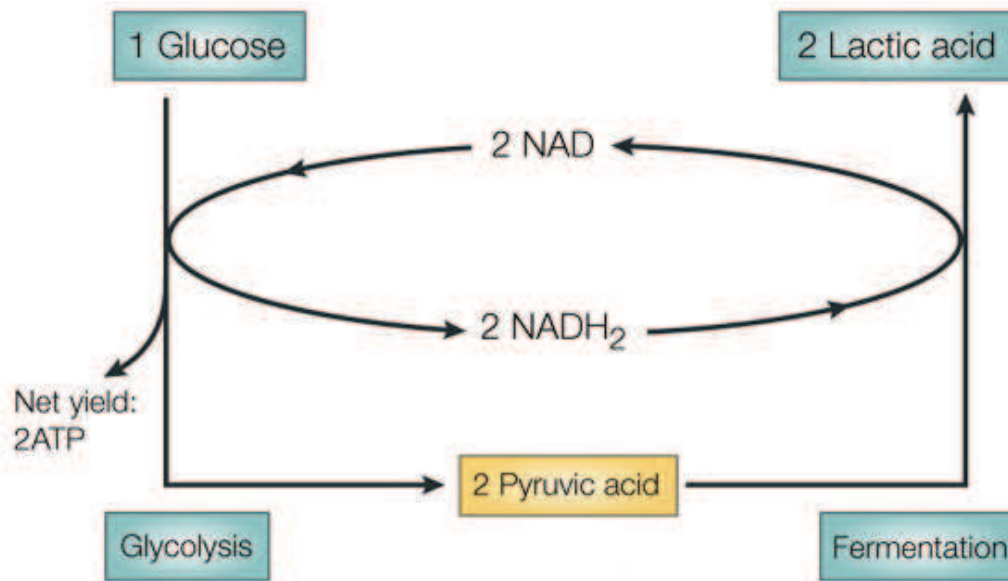
La glycolyse est une des voies cataboliques du glucose qui se déroule dans le cytoplasme de la cellule indépendamment de la présence d'oxygène. Au cours de cette réaction, le glucose (molécule à 6 atomes de carbone) est oxydé en deux molécules d'acide pyruvique (3 atomes de carbone). La glycolyse comprend 10 réactions successives dont les enzymes clés sont la phosphofructokinase 1 (PFK1), l'héxokinase et la pyruvate kinase qui sont responsables du caractère limitant et irréversible de la réaction. Le bilan énergétique net de la glycolyse est la production de deux moles d'ATP pour l'oxydation d'une mole de glucose oxydée.

De plus, la glycolyse ne peut exister qu'en présence de deux moles de co-enzymes oxydées  $\text{NAD}^+$  impliquant l'existence d'un système de réduction des co-enzymes pour pérenniser la réaction. Cette réduction de co-enzymes se fait grâce à la fermentation lactique ou la phosphorylation oxydative en fonction de l'état d'oxygénation de la cellule. De même, le devenir du pyruvate, produit final de la glycolyse, dépend également de l'état d'oxygénation de la cellule qui est utilisé soit pour la fermentation lactique en l'absence d'oxygène, soit pour la phosphorylation oxydative en présence d'oxygène.

## C. Fermentation lactique

En l'absence d'oxygène, la fermentation lactique est une simple réaction d'oxydo-réduction entre le pyruvate et la co-enzyme réduite ( $\text{NADH}, \text{H}^+$ ) permettant la régénération du ( $\text{NAD}^+$ ) indispensable pour la pérennisation de la glycolyse. Ainsi l'acide pyruvique sert d'accepteur final d'électron et est oxydé en acide lactique grâce à l'action de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) (Figure 3).

Compte-tenu de la faible différence de potentiel redox entre le ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}, \text{H}^+$ ) et pyruvate/lactate, cette réaction produit une oxydation partielle du glucose et est donc responsable d'un faible rendement énergétique. Le bilan énergétique net de la fermentation lactique est le même que celui de la glycolyse : deux moles d'ATP pour l'oxydation d'une mole de glucose oxydée.



**Figure 3 : REPRESENTATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE**

La fermentation lactique a un rendement énergétique très faible avec la production de deux moles d'ATP pour une mole de glucose oxydée par la glycolyse en l'absence d'oxygène. La fermentation lactique permet uniquement la régénération du (NAD<sup>+</sup>) pour pérenniser la glycolyse au prix d'une acidification.

#### D. Phosphorylation oxydative (OXPHOS)

En présence d'oxygène, la phosphorylation oxydative, appelée aussi respiration cellulaire, est un ensemble complexe de réaction chimique d'oxydo-réduction qui a lieu dans la mitochondrie, organe spécialisé dans la production énergétique, et qui permet une oxydation complète du glucose, responsable d'un rendement énergétique maximal (20 fois supérieur à la fermentation lactique). Cette réaction met en jeu le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs) permettant la régénération des co-enzymes réduites (NADH, H<sup>+</sup>) et (FADH<sub>2</sub>), et la chaîne de transport d'électron mitochondriale permettant la production d'ATP.

À l'issue de la glycolyse, le pyruvate est internalisé dans la mitochondrie pour subir une carboxylation oxydative en acétyl-CoA qui permet le transfert du groupe acétyle sur l'oxaloacétate (produit final du cycle de Krebs) pour reconstituer le citrate.

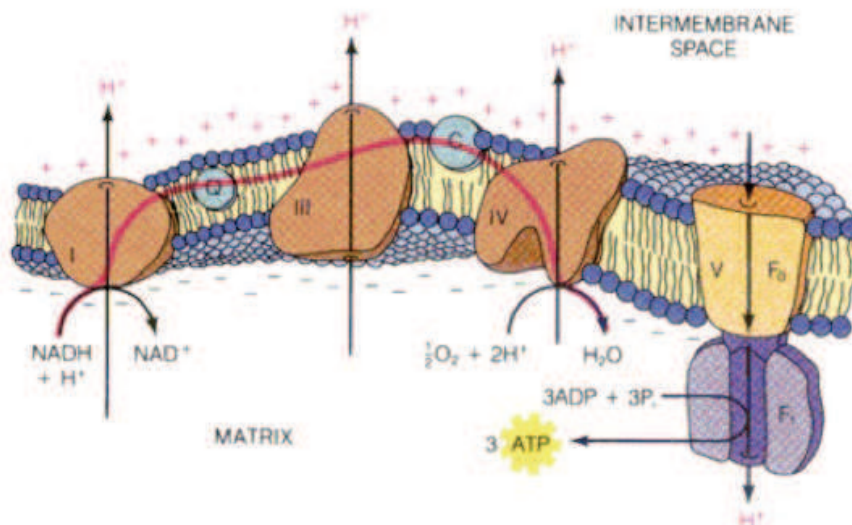
Le reste du cycle de Krebs consiste en série de 8 réactions chimiques d'oxydo-réduction et de carboxylation responsable de la régénération des co-enzymes réduites (NADH, H<sup>+</sup>) et (FADH<sub>2</sub>) et de l'oxydation complète du pyruvate en CO<sub>2</sub>.

La chaîne de transport d'électron mitochondriale est constituée d'une succession de 4 complexes (3 complexes transmembranaires enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie et 1 complexe membranaire à la face matricielle) au potentiel d'oxydo-réduction croissant dont les complexes I, II et III forment des pompes à proton (Figure 4). Les complexes I et II sont oxydés par les co-enzymes

réduites ( $\text{NADH}, \text{H}^+$ ) et ( $\text{FADH}_2$ ) issues du cycle de Krebs entraînant ainsi la création d'un gradient transmembranaire de proton. Les réactions d'oxydo-réduction se poursuivent aux complexes III et IV où l'accepteur final est l'oxygène qui est réduit en eau.

Au final, un puissant gradient transmembranaire de proton de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie est créé. Le complexe V, appelé ATP synthase ( $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPase), est un canal à proton convertissant l'énergie osmotique du gradient électrochimique à proton en énergie mécanique de transconformation permettant la synthèse ATP à partir de l'ADP.

Le bilan énergétique net de la phosphorylation oxydative à partir de l'oxydation complète du glucose est la production de 36 moles d'ATP pour 1 mole de glucose.



**Figure 4 : REPRESENTATION DE LA CHAÎNE DE TRANSPORT D'ÉLECTRON MITOCHONDRIALE**

L'ECT comprend 4 complexes impliqués dans le transport d'électron par l'intermédiaire de réaction d'oxydo-réduction selon un potentiel redox croissant jusqu'à l'oxygène qui est l'accepteur final d'électron formant ainsi de l'eau en présence de proton. Ces réactions d'oxydo-réduction permettent la création d'un gradient de proton de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie, participant au potentiel mitochondrial  $\Delta\psi_m$ . Ainsi le complexe V ou ATPsynthase ( $\text{F}_0\text{F}_1$  ATPase) qui est un canal à proton peut utiliser le gradient de proton comme source d'énergie pour produire de l'ATP à partir de l'ADP par transconformation.

### E. $\beta$ -oxydation des acides gras

La  $\beta$ -oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras qui sont transformés en acyl-CoA en présence d'ATP. Ainsi l'acyl-CoA pénètre dans la mitochondrie pour être transformé en acétyl-CoA et rejoindre la phosphorylation oxydative. Cette voie énergétique est plus énergétique que la dégradation du glucose mais elle est plus lente et nécessite la consommation initiale d'ATP.

### III. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

#### A. Généralités

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ROS) appartiennent à la famille des radicaux libres qui sont des composés chimiques avec un ou plusieurs électrons non appariés sur une orbitale externe. Ces molécules sont donc très instables et hautement réactives avec de nombreux composés impliqués dans des processus non spécifiques et expliquant leurs demi-vies très courtes. Cette réactivité des radicaux libres est responsable de réactions d'oxydation avec les différents composés cellulaires : protéines, ADN et lipides.

Parmi les radicaux libres, on distingue les radicaux primaires dérivés, soit de l'oxygène appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS), soit de l'azote appelés espèces réactives oxygène-azotées (RONS) et les radicaux secondaires formés par la réaction des radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule, comme la peroxydation lipidique.

#### B. Production des ROS

Chez tous les organismes vivants en aérobie, la cellule produit de façon physiologique des ROS en faible quantité sous forme d'anion superoxyde principalement ( $O_2^{\circ-}$ ) représentant 2% de la consommation d'oxygène de la cellule. Cette production, maîtrisée par un système anti-oxydant, joue un rôle majeur dans de nombreux mécanismes physiologiques, tel que la transmission du signal intracellulaire ou la phagocytose par les macrophages.

Donc en situation physiologique, la cellule possède un certain état redox avec un équilibre de la balance oxydant/anti-oxydant permettant son fonctionnement optimal. En cas de rupture de l'équilibre, la cellule subit un stress oxydant responsable de nombreuses lésions perturbant son métabolisme et pouvant conduire à la mort cellulaire.

La chaîne de transport d'électron (ECT) dans la mitochondrie représente la principale source de production de ROS de la cellule. L'ECT est composé de 5 complexes dont 4 complexes représentent une succession de réactions d'oxydo-réduction avec l'oxygène comme accepteur final d'électron, pour former de l'eau.

En situation physiologique, les complexes I (NADH-Ubiquinone réductase) et III (Ubiquinone-cytochrome c réductase) de l'ECT produisent la totalité de ROS par une réaction d'oxydoréduction incomplète de l'oxygène.

En situation d'ischémie-reperfusion, la membrane externe de la mitochondrie est perméabilisée par l'activation Bax-Bak responsable d'une libération du cytochrome c de l'espace inter-membranaire vers le cytosol. Ainsi, le transport d'électron dans l'ECT est interrompu au niveau du complexe III induisant une oxydation incomplète d'oxygène responsable d'une production d'ion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) lors de la reprise du fonctionnement du cycle ce Krebs et de l'ECT à la reperfusion<sup>30 31</sup>.

La roténone est un composé organique d'origine végétal utilisé dans des pesticides et insecticides. Elle agit en diminuant l'activité du complexe I de l'ECT bloquant le flux d'électron du complexe I vers le complexe III. Il en résulte une production de ROS, essentiellement ion superoxyde, par un flux d'électron inverse du complexe III vers le complexe I, initié par le complexe II (Succinate-Ubiquinone reductase).

De plus, il a été montré que la Metformine, anti-diabétique orale de la famille des biguanides, et les agents anesthésiques halogénés (sévoflurane, desflurane, isoflurane) possèdent les mêmes propriétés inhibitrices de l'activité du complexe I de l'ECT responsable d'une production de ROS<sup>19 20 21 22 23 24 25</sup>.

Chez les mammifères, à l'échelle d'un organisme, il existe une production de ROS extracellulaire par l'intermédiaire de l'hypoxanthine oxydo-réductase dans le sérum et une production de ROS par les polynucléaires neutrophiles recrutés via la NADPH oxydase<sup>34</sup>.

En situation de stress énergétique, l'ADP issu de l'hydrolyse de l'ATP, est à son tour hydrolyser en AMP pour maintenir la production d'ATP. L'AMP est alors catabolisée en adénosine et IMP (acide inosinique) qui sont expulsés dans le milieu extracellulaire, diminuant ainsi le stock en phosphate intracellulaire. Dans le milieu extracellulaire, l'IMP et adénosine sont dégradés en inosine et hypoxanthine. Lors de la reperfusion, l'hypoxanthine réagit avec l'eau et l'oxygène pour produire l'acide urique et des ROS par l'intermédiaire de la xanthine oxydo-réductase<sup>35</sup>.

### C. Système anti-oxydant

La cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...) et des petites molécules (vitamine E, vitamine C...) (Figure 5).

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines (Cuivre-Zinc, Manganèse) avec une activité enzymatique qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde  $O_2^{\circ-}$  en dioxygène et peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Elles sont localisées dans le cytosol, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale pour permettre une neutralisation rapide des ROS produits par la mitochondrie.

La catalase est également une métalloprotéine (Fer) qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en eau  $H_2O$  et dioxygène  $O_2$ . Elle est localisée dans le cytosol et les peroxyosomes.

Le glutathion existe dans le cytosol à l'état réduit (GSH) et oxydé (GSSG) formant un couple d'oxydoréduction important permettant un échange d'électron. Il permet l'élimination du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et des hydroperoxydes ROOH en eau  $H_2O$  et dioxygène  $O_2$ . L'enzyme glutathion peroxydase (GPx) accélère la réaction de détoxification. Le glutathion oxydé est réduit grâce à l'enzyme glutathion réductase afin de maintenir la détoxification.

Au total, les SOD et les peroxydases (GPX et Catalase) sont complémentaires et constituent un système anti-oxydant performant. Malheureusement, dans certaines situations physiopathologiques, telle que l'ischémie-reperfusion, le système de détoxification peut être dépassé, empêchant la neutralisation des ions superoxydes produits qui sont source de lésions cellulaires.

#### D. Lésions induites par le stress oxydant

Les ROS, non neutralisés par le système anti-oxydant, sont capables de réagir rapidement avec de nombreux composés cellulaires qui vont altérer le métabolisme et l'intégrité cellulaire pouvant conduire à la mort cellulaire. Les ROS induisent une réaction d'oxydation de l'ensemble des constituants de la cellule : lipides, protéines, ADN, glucides.

La peroxydation des lipides correspond à une réaction d'oxydation en chaîne des acides gras (AG) polyinsaturés par les ROS, entraînant la formation de radicaux peroxylysés ( $ROO^\circ$ ) qui sont des radicaux secondaires. La peroxydation des lipides provoque une fluidification de la membrane plasmique et de l'ensemble des organites intracellulaires avec pour conséquence une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiol et une perméabilisation des membranes, notamment mitochondriale.

L'oxydation de l'ADN par les ROS entraîne la formation de bases oxydées, de sites abasiques, d'adduits intra-caténaires, de cassures de brins et de pont qui altèrent la transcription de l'ADN en ARNm.

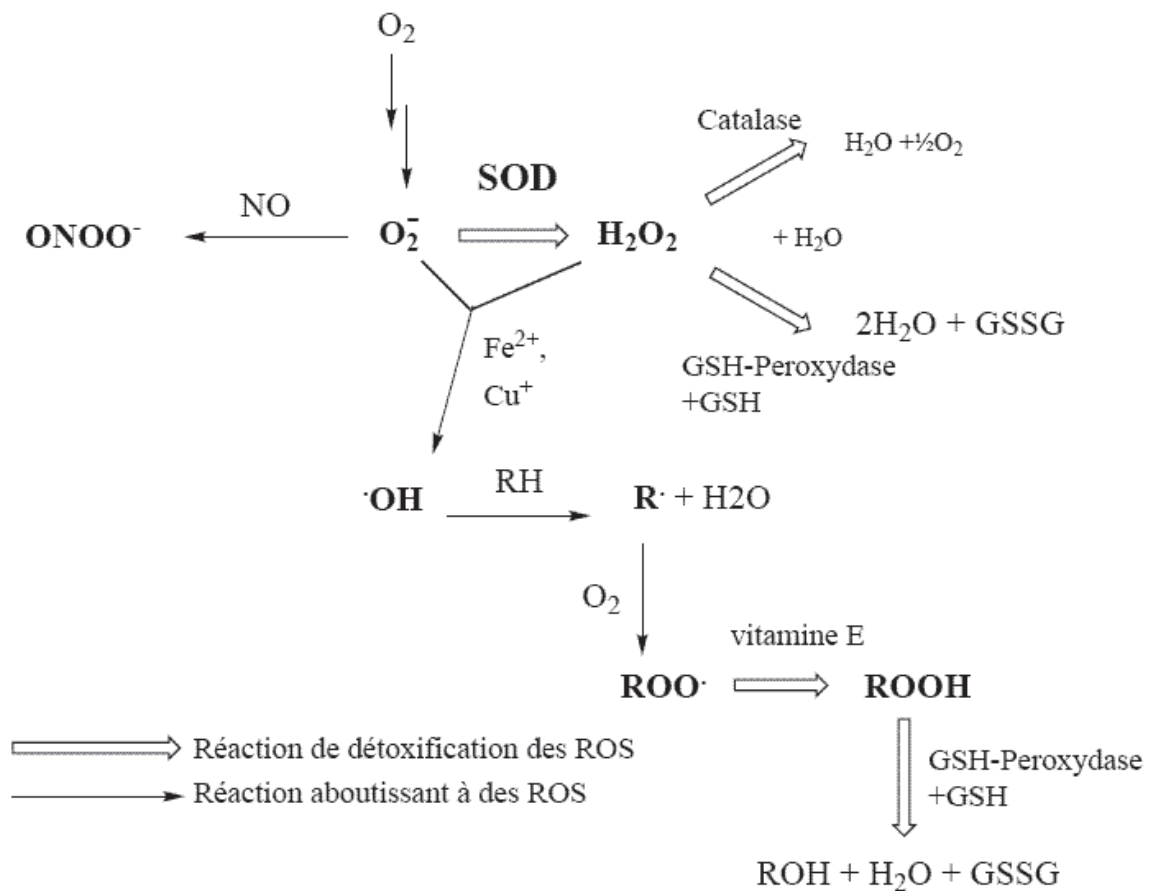
L'oxydation des protéines par les ROS induit la formation de groupement sulfhydryle (SH), de pont, de coupure et d'amas protéique qui conduisent à une inactivation des protéines par une modification de leur conformation spatiale.



L'ensemble des lésions induites par les ROS peut conduire à la mort cellulaire par apoptose <sup>36</sup>.

### E. Rôle ambivalent des ROS

Les ROS sont bien connus pour leur effet toxique sur la cellule mais il y a un nombre croissant de preuve démontrant un effet bénéfique des ROS. Ils agiraient comme des seconds messagers et seraient impliqués dans de nombreuses voies de signalisation et d'activation de la transcription.



**Figure 5 : CARACTERISATION DES ROS ET DU SYSTÈME ANTI-OXYDANT**

L'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  est le principal radical libre primaire produit à partir de l'oxygène au niveau de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie. Le système anti-oxydant comprend plusieurs protéines et enzymes permettant la neutralisation des ROS. La superoxyde dismutase permet la transformation de l'  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui est ensuite transformé en eau par la catalase et le glutathion. L'  $\text{O}_2^{\cdot-}$  peut réagir avec le NO produit par la NO synthase et former des espèces réactives oxygène-azotées (ONOO<sup>•</sup>).

## IV. La mort cellulaire

### A. Généralités

La mort cellulaire est un événement qui survient en condition physiologique pour maintenir l'homéostasie tissulaire ou en situation de stress physique ou chimique. Elle est divisée en 2 deux groupes : d'une part la mort cellulaire programmée, appelée apoptose, qui permet l'élimination d'une cellule sans endommager son environnement, et d'autre part la mort cellulaire non programmée, appelée nécrose, qui résulte d'une rupture de la membrane cytoplasmique contaminant le milieu extracellulaire induisant une réaction inflammatoire délétère<sup>37</sup>.

Ces dernières années, de nombreux mécanismes de mort cellulaire ont été identifiés et regroupés dans une classification par la NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death)<sup>38</sup>.

### B. Apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort programmée indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire par élimination des cellules surnuméraires et des cellules potentiellement dangereuses. Ce type de mort fut décrit par Kerr et al.<sup>37</sup> en 1972 après observation de modifications morphologiques différentes de la nécrose.

L'apoptose se caractérise morphologiquement par un arrondissement de la cellule, la condensation du cytoplasme, la condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau suivi d'un bourgeonnement de la membrane plasmique avec la formation de bulles, appelées corps apoptotiques, qui seront phagocytées par les cellules avoisinantes (Figure 7).

De plus, l'apoptose se caractérise par de nombreux processus biochimiques spécifiques :

- Au niveau mitochondrial : par une perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie responsable d'une libération du cytochrome C, une chute du potentiel membranaire mitochondrial et une perte des fonctions mitochondriales empêchant la survie de la cellule.
- Au niveau cytoplasmique : par une activation des caspases qui sont des protéases responsable du clivage des protéines majeures impliquées dans la survie et la mort cellulaire. Leur activation induit une cascade de réaction qui est irréversible.

- Au niveau membranaire : par une externalisation des phosphatidylsérines de la membrane plasmique responsable de l'initiation de la phagocytose par les cellules environnantes.
- Au niveau nucléaire : par une fragmentation internucléosomale de l'ADN responsable d'une abolition de la transcription des gènes de survie.

Ainsi, une cellule mourante en apoptose doit regrouper l'ensemble de critères morphologiques et biochimiques. Dans le cas contraire, il s'agit d'une mort non apoptotique dite mort indépendante des caspases.

Chez les mammifères, l'apoptose regroupe 2 mécanismes d'initialisation, la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie et la voie extrinsèque faisant intervenir les récepteurs de mort transmembranaires.

#### 1. Voie extrinsèque de l'apoptose

L'apoptose extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort, est induite par un signal de stress extracellulaire qui est détecté et transmis par des récepteurs transmembranaires spécifiques.

Elle peut être initiée par la liaison de ligand de mort tels que Fas/CD95 ligand (FasL/CD95L), TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et les ligands de la famille TNF (comme TRAIL), à différents récepteurs : Fas/CD95, TNFR1 (récepteur à TNF $\alpha$ ), récepteurs à TRAIL... Ces récepteurs contiennent un domaine de mort cytoplasmique dit DD (Death Domain) qui est nécessaire pour l'activation directe de la cascade apoptotique.

Après liaison du ligand, le récepteur de mort se trimérise puis recrute, par l'intermédiaire de son DD, des protéines adaptatrices spécifiques pour former le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Le DISC active la procaspase 8 qui à son tour active et clive la caspase 3 induisant ainsi l'apoptose (voie de signalisation type 1).

Pour des faibles niveaux de caspase 8 active, le signal de mort peut être amplifié par le clivage de Bid par la caspase 8 (voie de signalisation type 2). La forme tronquée de Bid, dit tBid, permet sa translocation dans la mitochondrie où il est capable d'interagir avec Bax et Bak et ainsi activer la voie intrinsèque de l'apoptose (Figure 6).

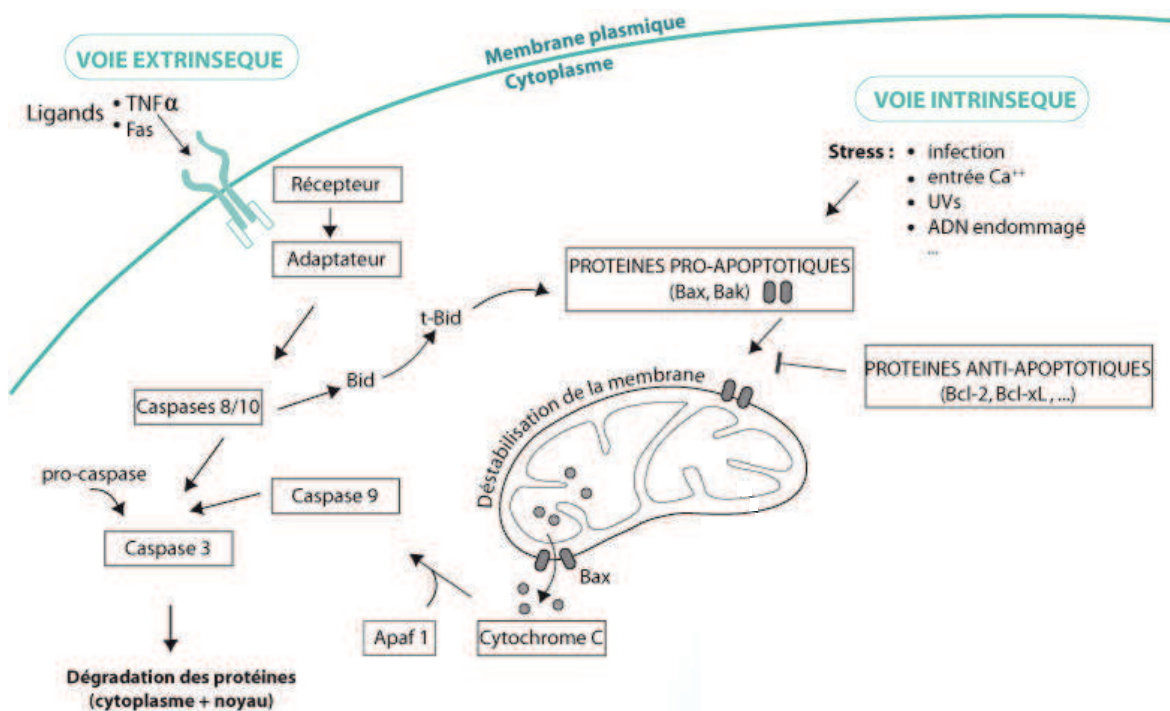
#### 2. Voie intrinsèque de l'apoptose

L'apoptose intrinsèque est la voie d'induction la plus fréquente impliquant la mitochondrie. Elle peut être déclenchée par divers stress intracellulaires : dommages à l'ADN, choc thermique, UV, agents chimiothérapeutiques, stress

oxydatif, surcharge calcique, accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique...

Ces stimuli sont intégrés au niveau de la mitochondrie par les protéines de la famille Bcl-2 aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP pour Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization). La MOMP est dépendante de l'oligomérisation de Bax et Bak (membres pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui forme un pore dans la membrane externe mitochondriale conduisant à la libération des protéines de l'espace intermembranaire vers le cytosol.

Parmi ces protéines, le cytochrome c s'associe avec Apaf-1 et la procaspase 9 pour former un complexe nommé apoptosome. Ce complexe permet une amplification du signal de mort par une auto-activation de la caspase 9 qui à sa tour active la caspase 3 (Figure 6) <sup>39</sup>.



**Figure 6 : REPRESENTATION DE L'APOPTOSE**

La voie extrinsèque met en jeu les récepteurs de mort qui sont activés par la liaison à des ligands, tels que TNF $\alpha$  et Fas-ligand, pour induire une cascade d'activation conduisant à l'activation de la caspase 8 puis de la caspase 3 responsable du processus de mort. La voie intrinsèque est induite par un stress intracellulaire, tel que IR et UV, et met en jeu la mitochondrie dont la membrane externe se perméabilise par oligodimérisation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax et Bak), responsable d'une libération du cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c cytosolique permet la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9 qui sont responsables de l'activation de la caspase 3. La voie extrinsèque peut amplifier le signal de mort en activant la voie intrinsèque par l'intermédiaire de l'activation de la protéine pro-apoptotique Bid.

### 3. Caspases

Les caspases (Cysteine-dependent ASpartate-specific proteASES) sont des protéases à cystéine constituant une famille de protéines composée de 12 membres (caspase 1 à 10, 12 et 14). Elles sont essentielles dans les processus d'apoptose, d'inflammation et de différenciation. Elles sont présentes dans le cytosol sous leur forme pro-enzyme inactive.

Les caspases impliquées dans l'apoptose se distinguent en 2 groupes : les caspases initiatrices (caspase 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7).

Les caspases initiatrices 8 et 10 sont recrutées au niveau du DISC des récepteurs de mort de la voie extrinsèque. Leur activation au sein du DISC permet le clivage de Bid qui amplifie ainsi le signal par l'intermédiaire de la mitochondrie (voie de signalisation type 2) et/ou l'activation directe des caspases effectrices (voie de signalisation type 1). La caspase initiatrice 9 est recrutée, grâce à Apaf-1 et au cytochrome c, au sein de l'apoptosome qui est essentiel au déroulement du processus apoptotique de la voie intrinsèque. Son activation au sein de l'apoptosome permet une amplification du signal par son auto-activation et une activation directe des caspases effectrices.

Les caspases effectrices 3, 6 et 7 sont les principaux effecteurs du signal apoptotique. Après activation par les caspases initiatrices, elles sont responsables du clivage de la majorité des substrats au cours de l'apoptose. Les substrats des caspases effectrices sont impliqués dans le maintien de l'intégrité structurale de la cellule, dans la réparation de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire, dans la signalisation cellulaire, dans les fonctions mitochondriales, dans la fragmentation de l'ADN ou dans l'exécution de l'apoptose (caspases, Bid). Le clivage de ces substrats induit un gain ou une perte de fonction, permettant de réguler ou de favoriser la mort cellulaire<sup>40</sup>.

Le processus d'activation des caspases est irréversible et finement contrôlé pour éviter une induction accidentelle de l'apoptose par des protéines inhibitrices. Parmi celle-ci, les protéines de la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) sont connues pour leur effet anti-apoptotique par liaison et séquestration des caspases.

### C. Mort indépendante des caspases

Les morts indépendantes des caspases représentent un ensemble de mécanisme de mort caractérisée par l'absence d'activation des caspases. Des processus de mort distincts répondant à ce critère ont pu être caractérisés : nécrose, nécroptose, autophagie, CICD...

#### 1. Nécrose et Nécroptose

La nécrose se caractérise morphologiquement par une absence de condensation de la chromatine, absence de fragmentation de l'ADN, une augmentation du volume cytoplasmique, un gonflement des organelles, la rupture précoce de la membrane plasmique, et par conséquent la perte du contenu intracellulaire (Figure 7).

Pendant de nombreuses années, la nécrose a été définie comme une mort cellulaire accidentelle et incontrôlée, cependant la nécrose peut être régulée par des voies de signalisation et des mécanismes cataboliques <sup>38</sup>. Le terme de nécroptose désigne cette forme régulée de la nécrose. Elle est observée en présence de stimuli apoptotiques de la voie extrinsèque de l'apoptose, par l'intermédiaire des récepteurs de mort et des Toll-like Recepteur (TLR), et en présence d'inhibiteur des caspases, avec les caractéristiques morphologiques de la nécrose <sup>41</sup>.

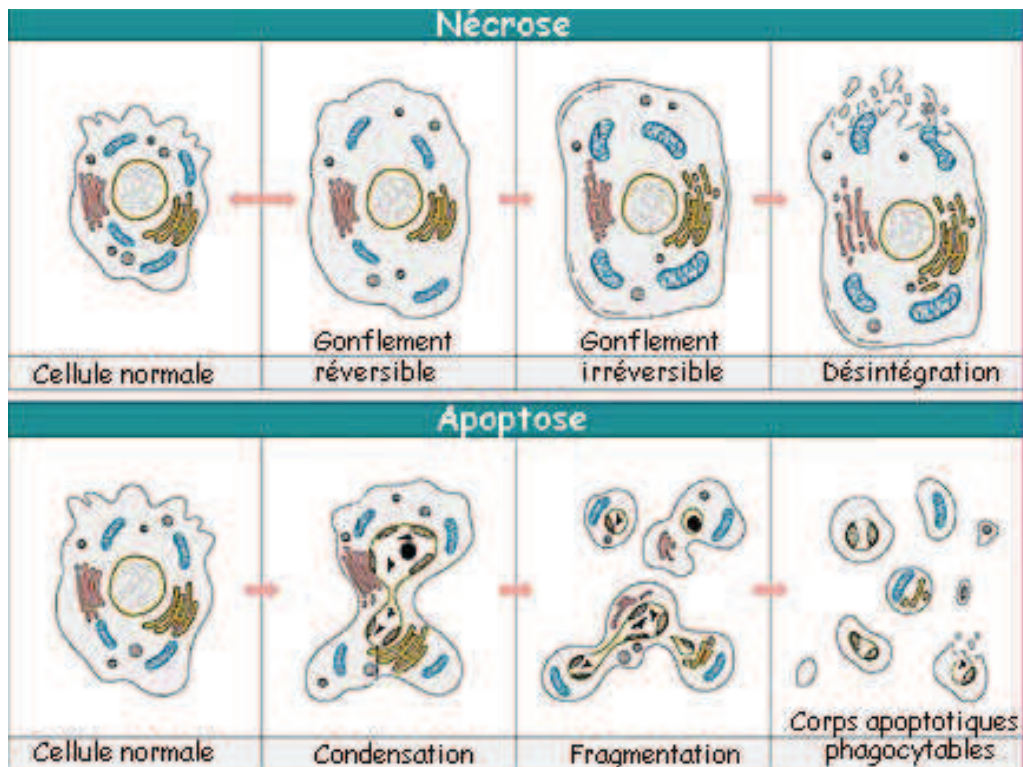


Figure 7 : CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROSE

## 2. Autophagie

La mort cellulaire autophagique est un concept très débattu. En effet, l'autophagie est souvent décrite comme un processus accompagnant la mort cellulaire et peu comme un mécanisme directement responsable de mort cellulaire.

Pour être qualifié de mort autophagique, la cellule mourante doit présenter les critères suivants : mort cellulaire non-apoptotique indépendante des caspases, augmentation des marqueurs de l'autophagie (vacuolisation cytoplasmique, lipidation LC3/ATG8, dégradation p62/SQSTM1, formation d'autophagosomes) et une prévention de la mort cellulaire autophagique par une approche pharmacologique (inhibiteur) ou génétique (siRNA) <sup>42</sup>.

## 3. CICD

La CICD (Caspase Independent Cell Death) est une mort cellulaire indépendante des caspases en réponse à un stimulus induisant normalement l'apoptose, qui présente certains critères d'apoptose comme la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) et l'absence d'autres critères d'apoptose comme l'externalisation des phosphatidylsérines. La CICD a lieu avec une cinétique plus lente que l'apoptose et pourrait constituer un mécanisme de secours permettant l'élimination des cellules lorsque la voie apoptotique est déficiente <sup>43</sup>.

## V. Les protéines de la famille Bcl-2

### A. Généralités

Les membres de la famille Bcl-2 (B-cell CLL / Lymphoma-2) régulent l'intégrité de la membrane mitochondriale externe. Ils sont constitués de domaines BH (Bcl-2 Homology) qui les divisent en 3 groupes :

- Bcl-2 pro-apoptotique effectrice: Bax (Bcl-2 Associated X protein), Bak (Bcl-2 Antagonist Killer 1) et Bok (Bcl-2-related Ovarian Killer), sont des protéines effectrices qui induisent directement la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) par oligodimérisation.
- Bcl-2 pro-apoptotique BH3-only (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma, Hrk, Bmf) sont caractérisées par leurs capacités à interagir avec les protéines pro-apoptotiques effectrices et les protéines anti-apoptotiques.
- Bcl-2 anti-apoptotique Bcl-2, Bcl-xL (Bcl-2-related gene long isoform), Bcl-w, A1 (Bcl-2-related gene A1), Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia 1), sont des protéines inhibitrices qui interagissent avec les protéines pro-apoptotiques pour empêcher la MOMP.

### B. Activation Bax-Bak

Les protéines Bax et Bak sont responsables de la MOMP. Ces 2 protéines sont quasi-redondantes mais de localisation différente : Bax est cytosolique et Bak est intégrée à la membrane mitochondriale externe.

Après un signal de mort, Bax et Bak interagissent pour former des dimères et conduire ainsi à la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe mesurant 25-100nm.<sup>44</sup> La nature de ce pore n'est pas clairement déterminée mais sa formation est responsable de la fuite du contenu de l'espace intermembranaire mitochondriale, notamment une libération du cytochrome c et dissipation du potentiel mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) par fuite de protons. D'autres protéines sont également libérées : Smac/Diablo, AIF, Omi/HtrA2 favorisant la mort cellulaire par apoptose en inhibant la fonction des protéines IAP inhibitrices des caspases.

Les protéines Bax et Bak sont présentes dans la cellule sous forme inactive et leur activation après un signal de mort est régulée par les autres membres de la famille Bcl-2<sup>45</sup>.

Bax et Bak peuvent être activés de manière indirecte. Les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) séquestrent Bax et Bak pour empêcher la MOMP. Après un signal de mort, les protéines BH3-only induites vont interagir et être séquestrées par les protéines anti-apoptotiques pour permettre la libération de Bax et Bak qui deviendront alors actifs (Figure 8)<sup>46</sup>.



Bax et Bak peuvent également être activés de manière directe par interaction avec les protéines BH3-only.

### C. Apoptosome

La libération du cytochrome c dans le cytosol après la MOMP par Bax-Bak conduit à la formation d'un complexe protéique, l'apoptosome, constitué par Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1), le cytochrome c et la procaspase 9.

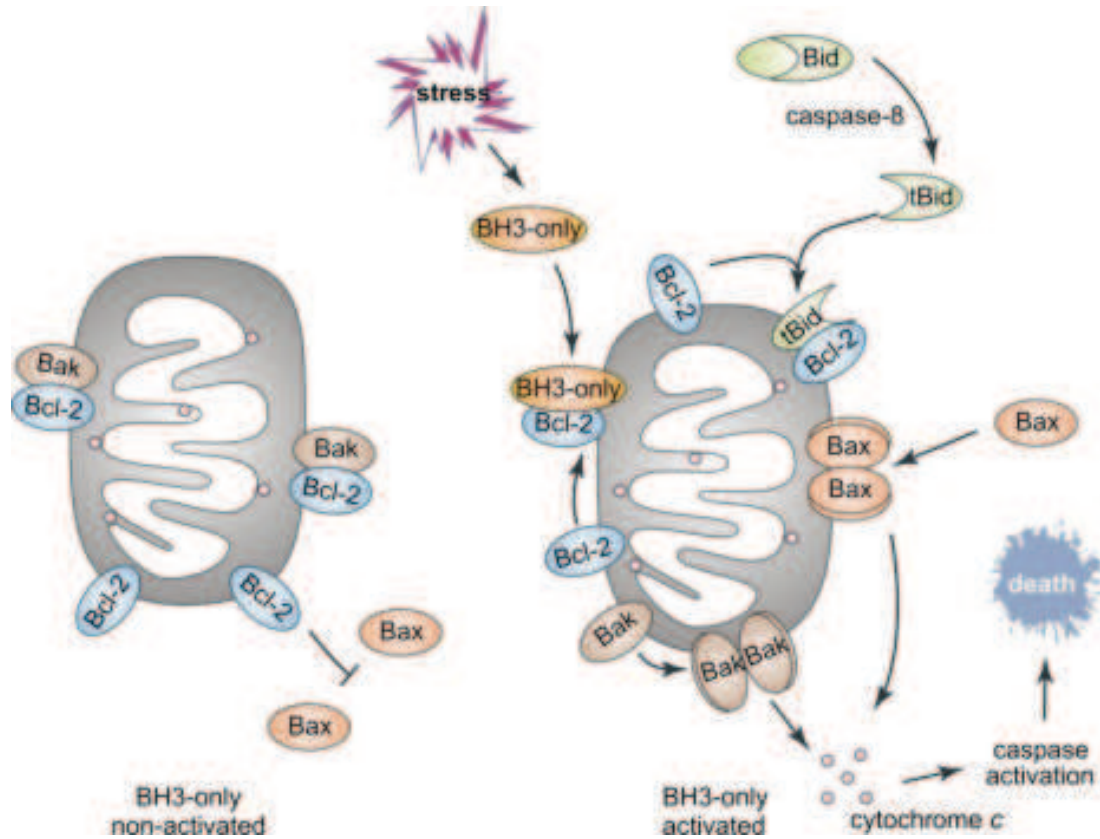
En l'absence de cytochrome c, Apaf-1 est sous forme monomérique dans le cytosol et ne peut pas activer la procaspase 9. Lorsque le cytochrome c est libéré dans le cytosol, il se fixe à Apaf-1 qui change de conformation, permettant son heptamérisation en présence d'ATP. Ainsi la procaspase 9 est recrutée et activée pour amplifier le signal par auto-activation et pour activer les caspases effectrices.

### D. Régulation des protéines Bcl-2 anti-apoptotiques

Les membres de la famille Bcl-2 sont régulés par différents mécanismes au niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel (clivage, phosphorylation, dégradation, séquestration...) pour déclencher ou empêcher le signal apoptotique. A l'état basal, les membres Bcl-2 sont localisés dans différents compartiments subcellulaires. Suite à un signal de mort, ils sont relocalisés à la membrane mitochondriale externe pour induire ou inhiber la MOMP.

Parmi les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques, la protéine Bcl-xL est connue pour son effet anti-apoptotique en inhibant l'activation Bax-Bak par séquestration. Bcl-xL peut être régulée à différents niveaux :

- Au niveau transcriptionnel, l'expression de Bcl-xL est régulée par plusieurs facteurs de transcription, tels que NF $\kappa$ B<sup>47</sup>, STAT5, EVI1, le complexe c-Jun-ATF2, HIF1 $\alpha$ <sup>48</sup>, la voie PI3K/Akt via la phosphorylation inhibitrice de FoxO et de Bcl-6<sup>49</sup>, et les facteurs de transcription de la famille Ets.
- Au niveau post-transcriptionnel, le pré-ARNm subit un épissage alternatif donnant soit une forme courte de Bcl-xL, Bcl-xS capable d'induire l'apoptose, et une forme longue, Bcl-xL qui inhibe l'apoptose.
- Au niveau post-traductionnel, la protéine Bcl-xL peut subir des modifications telles qu'une phosphorylation ou une déphosphorylation qui modifient son interaction avec les protéines pro-apoptotiques. Elle peut subir également une ubiquitination entraînant sa dégradation, une désamination ou une méthylation modifiant son interaction avec les protéines BH3-only.



**Figure 8 : REPRESENTATION DES MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2**

En l'absence de signal de mort, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) empêchent la perméabilisation de la membrane mitochondriale en inhibant l'oligodimérisation de Bax et Bak. En réponse à un stress, les protéines pro-apoptotique BH3-only, telle que Bid, sont activées et sont responsables d'une activation de Bax-Bak soit directement, soit indirectement par séquestration des protéines anti-apoptotiques Bcl-2. Ainsi la membrane mitochondriale externe est perméabilisée et va induire la mort cellulaire par la libération des protéines inter-membranaires telle que le cytochrome c indispensable pour la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase 3.

## VI. Les moyens de protection vis-à-vis de l'IR

### A. Généralités

En clinique, l'ischémie-reperfusion est responsable d'une forte mortalité ou de lourdes séquelles. En chirurgie programmée toute spécialité confondue, l'ischémie-reperfusion myocardique représente la première cause de morbi-mortalité <sup>1</sup>. Dans les suites d'un arrêt cardio-circulatoire ressuscité, l'ischémie-reperfusion cérébrale représente la première cause de mortalité et de séquelles neurologiques lourdes. Donc de nombreuses techniques pour limiter ou prévenir les lésions induites par l'ischémie-reperfusion ont été développées.

L'hypothermie thérapeutique est la technique la plus ancienne connue et la plus utilisée actuellement, permettant de réduire les lésions d'ischémie-reperfusion. Son effet neuroprotecteur a été prouvé en situation d'ischémie-reperfusion cérébrale au décours d'un arrêt cardio-circulatoire ressuscité <sup>50</sup>. Son effet cardioprotecteur a été prouvé en situation d'ischémie-reperfusion myocardique au cours des chirurgies cardiaques à cœur arrêté.

Sur le plan biologique, l'hypothermie permet de réduire les lésions induites par l'ischémie et par la reperfusion. Durant la phase d'ischémie, l'hypothermie permet le maintien de l'homéostasie électrolytique en stabilisant les lipides membranaires, qui limite les flux ioniques transmembranaires, et en réduisant le métabolisme cellulaire qui permet de diminuer les besoins en ATP de la cellule au profit des pompes ioniques.

Durant la phase de reperfusion, l'hypothermie réduit la production d'espèce réactive de l'oxygène et la réponse inflammatoire immunitaire, limitant ainsi les lésions protéiques, lipidiques et nucléaires. Malheureusement, l'hypothermie n'est pas toujours applicable et n'est pas dénuée d'effets indésirables graves (trouble du rythme, trouble de l'hémostase, risque infectieux).

A l'état physiologique, tous les organismes vivants en aérobiose produisent des ROS. Ainsi, il existe, dans la cellule, un système antioxydant composé de molécules et d'enzymes anti oxydantes neutralisant les ROS produits et empêchant ainsi la génération de lésions de l'ADN, des lipides et des protéines. Les molécules anti-oxydantes sont le glutathion, la vitamine C, la vitamine E, l'acide-alpha-lipoïque..., et les enzymes anti-oxydantes sont la superoxyde dismutase, la catalase, la peroxydase... En situation d'ischémie-reperfusion, l'apport exogène de molécules anti-oxydantes, comme le N-acétyl-cystéine, la vitamine C ou E n'ont pas fait la preuve de leur efficacité <sup>43 52</sup>.

## B. Préconditionnement

Le preconditionnement est basé sur le concept d'adaptation cellulaire où lorsqu'une cellule est soumise à un stress sublétalement (courte durée et faible intensité), celle-ci est capable secondairement de résister à une nouvelle exposition de ce stress mais à une dose qui lui est normalement létale.

### 1. Préconditionnement ischémique (IPC)

Murry et Jennings <sup>2</sup> ont appliqué le concept de preconditionnement vis-à-vis de l'ischémie-reperfusion myocardique et ils ont montré l'efficacité du preconditionnement dit ischémique sur la réduction de la taille de l'infarctus du myocarde au décours d'une occlusion coronaire réalisée chez le chien. Depuis cet article référence, de très nombreuses études ont confirmées l'effet protecteur de l'IPC aussi bien chez l'animal que chez l'homme.

L'IPC correspond à la réalisation d'une succession de brèves séquences d'ischémie de 5 minutes espacées de courtes séquences de reperfusion de 5 minutes avant la survenue d'une occlusion coronaire prolongée.

Expérimentalement, il a été montré que l'IPC est le phénomène protecteur connu le plus puissant pour limiter les lésions induites par l'IR. Malheureusement, les applications cliniques de l'IPC ne sont pas sans danger et ne sont pas toujours réalisables. C'est pourquoi, il a été développé d'autres méthodes de preconditionnement par des agents pharmacologiques, telle que l'adénosine, le nicorandil mais également les agents anesthésiques utilisés en routine de la famille des éthers halogénés.

### 2. Préconditionnement anesthésique (APC)

Les agents anesthésiques de la famille des éthers halogénés sont des agents hypnotiques utilisés quotidiennement au bloc opératoire pour l'induction et l'entretien d'une anesthésie générale.

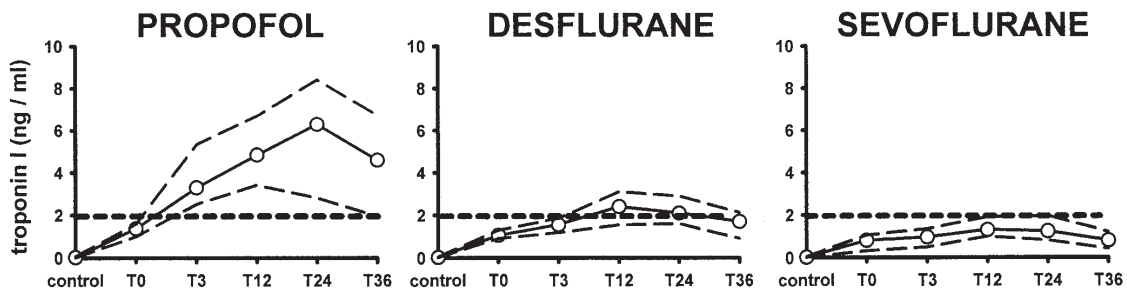
On distingue plusieurs molécules ayant les mêmes propriétés : halothane, enflurane, isoflurane, sévoflurane et desflurane. Ce sont des composés volatiles dont l'administration est réalisée par voie respiratoire par l'intermédiaire d'un ventilateur spécifique associé à un vaporisateur. Ils sont également très liposolubles ce qui leur confère la propriété de diffusion passive à travers la membrane plasmique et la membrane des organites intracellulaires.

A côté de leur effet hypnotique, Bland et Lowenstein <sup>3</sup> ont rapporté pour la première fois une diminution des anomalies électrocardiographiques (analyse du segment ST) durant une ischémie myocardique par l'occlusion de l'artère

interventriculaire antérieure (IVA) chez des chiens ayant bénéficiés d'une exposition préalable à l'halothane.

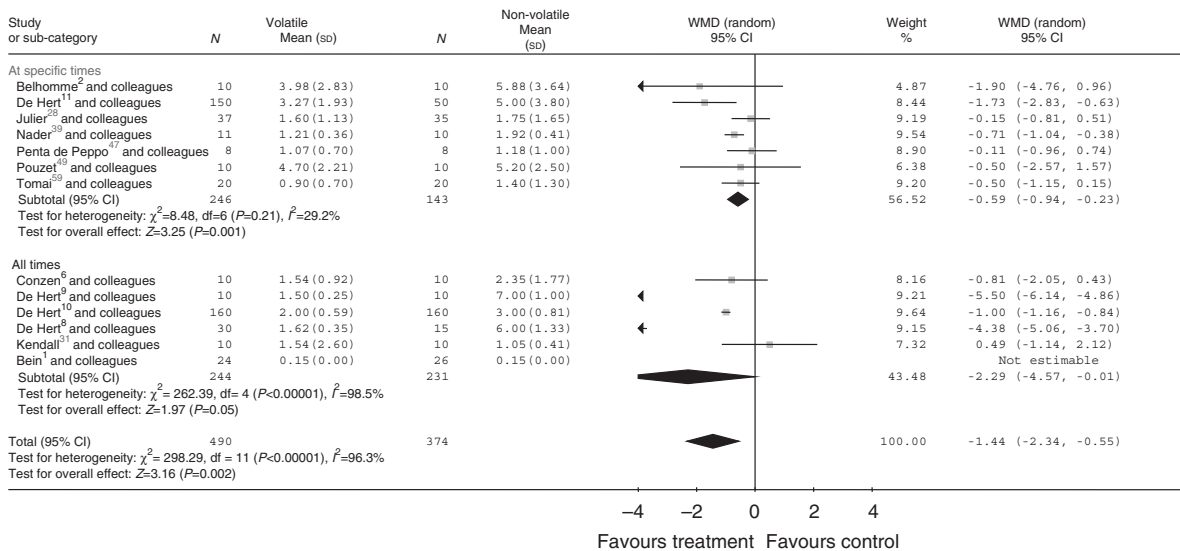
Depuis la publication de cet article référence, de très nombreuses études ont fait la preuve de l'effet cardioprotecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR myocardique tant chez l'animal <sup>4 5 6 7 8</sup> que chez l'homme <sup>9 10 11 12 13 14 15 16 17 18</sup> (Figure 9).

Symons et Myles <sup>17</sup> ont analysé 27 études cliniques incluant 2979 patients opérés d'un pontage aorto-coronaire. Chez les patients qui ont bénéficié d'un agent anesthésiques volatiles en comparaison à un agent intra-veineux, la libération de troponine I post-opératoire était diminuée et l'index cardiaque au décours de la CEC était meilleur associé à une diminution du recours aux agents inotropes (Tableau 1).



**Figure 9 : L'APC DIMINUE LA LIBÉRATION DE LA TROPONINE EN POST-OPERATOIRE D'UNE CHIRURGIE CARDIAQUE À CŒUR ARRÊTÉ (De Hert et al, Anesthesio, 2003) <sup>9</sup>**

Dosage de la troponine I en pré-opératoire et durant les 36h post-opératoire d'une chirurgie cardiaque à cœur non battant pour pontage aorto-coronaire. L'étude inclus 15 patients par groupe qui sont appariés sur âge, sexe, IMC, FEVG, antécédents et prémédications. Les valeurs sont exprimées en moyennes et en intervalles de confiance de 95%. Une valeur seuil de troponine I > 2ng/ml est considérée comme une valeur positive de souffrance myocardique



**Tableau 1 : L'APC DIMINUE LA LIBÉRATION DE LA TROPONINE POST-OPERATOIRE DANS LES SUITES D'UNE CHIRURGIE CARDIAQUE À CŒUR ARRÊTÉ (Symons et al, BJA, 2008) <sup>17</sup>**

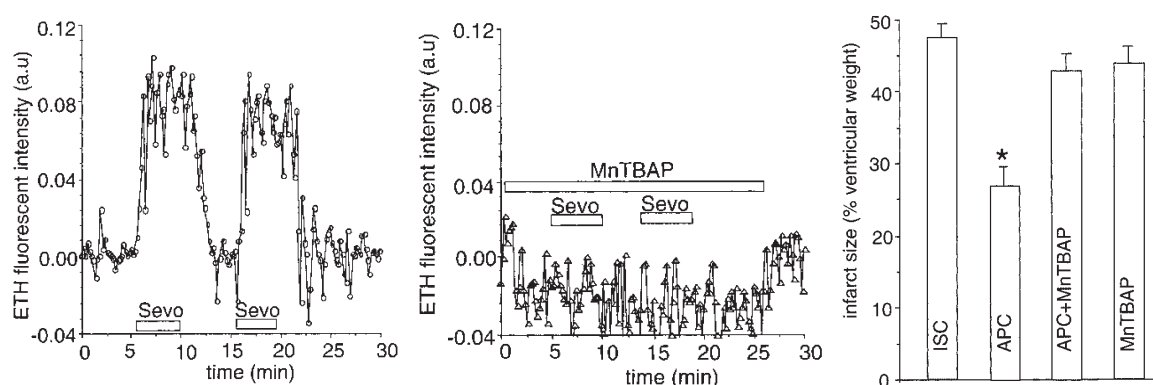
Méta-analyse de 27 études cliniques regroupant 2979 patients ayant bénéficiés d'un pontage aorto-coronaire et d'une anesthésie soit aux agents anesthésiques volatiles, soit aux agents anesthésiques intra-veineux (Propofol, Benzodiazépine, Thiopentone). Les résultats sont exprimés en risque relatif approché (OR, Odd Ratio) et en intervalle de confiance de 95%

### 3. Mécanisme de l'IPC et de l'APC

Bien que l'IPC et l'APC soient connus depuis de longue date, les mécanismes d'action et les voies de signalisation sont encore mal connus. Les mécanismes responsables de la protection myocardique par les agents anesthésiques ressemblent partiellement à ceux impliqués dans l'IPC.

La plupart de ces mécanismes ont été largement étudiés expérimentalement dans des modèles animaux. L'activité des récepteurs couplés aux protéines G, la fonction des canaux ioniques, les kinases de signalisation intracellulaire, la régulation de l'apoptose, la production d'espèce réactive l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), l'expression génique et la physiologie mitochondriale ont montré jouer un rôle important dans l'effet protecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR myocardique<sup>18 53 54</sup>.

Kevin et al.<sup>19</sup> ont montré que le sévoflurane induit une faible et transitoire production de ROS, dont l'abolition par l'utilisation de ROS scavenger (MnTBAP) inhibe l'effet protecteur de l'APC sur des cœurs isolés de cochon d'inde (Figure 10). Hirata et al.<sup>23</sup> ont étudié l'effet du isoflurane sur des mitochondries isolées de rat et ils ont montré que l'isoflurane module la production de ROS par la mitochondrie en diminuant l'activité du complexe I de l'ECT responsable d'une production modérée de ROS, et en abolissant le flux inverse d'électron du complexe III au complexe I responsable d'une diminution de la production de ROS lors de la reperfusion.



**Figure 10 : IMPLICATION DES ROS DANS LE MÉCANISME DE L'APC**  
(Kevin et al, *Anesthesiology*, 2003)<sup>19</sup>

Mesure de la quantité de ROS par fluorescence (sonde de dihydroéthidium ETH) en présence de sévoflurane seul ou avec un ROS scavenger (MnTBAP). Mesure de la taille de l'infarctus du myocarde. ISC, ischémie ; APC ; MnTBAP, ROS scavenger

Plusieurs auteurs ont montré une participation de la protéine kinase C (PKC) dans le mécanisme de l'APC. La PKC est une protéine de transduction du signal activé par le diacylglycérol (DAG) en présence de calcium. Uecker et al.<sup>55</sup> ont décrit une phosphorylation et une translocation de la PKC $\delta$  du cytosol vers la mitochondrie induit par l'isoflurane dont l'abolition inhibe l'effet protecteur de l'APC. De même, Bouwman et al.<sup>22</sup> ont montré que le sévoflurane induisait une translocation de PKC $\delta$  de manière ROS-dépendante dont l'utilisation de ROS scavenger (MPG) inhibe la translocation de PKC $\delta$  et l'effet protecteur de l'APC.

Les canaux potassiques mitochondriaux ATP-sensibles (canaux mitoK<sub>ATP</sub>) ont été rapportés comme des effecteurs potentiels de l'IPC et de l'APC. Les canaux mitoK<sub>ATP</sub> sont présents dans la membrane interne de la mitochondrie et participent à l'homéostasie mitochondriale, notamment dans la régulation du calcium matriciel et le potentiel mitochondrial pour préserver la fonction mitochondriale. Toller et al.<sup>56</sup> ont montré une implication des canaux mitoK<sub>ATP</sub> dans l'APC où l'utilisation d'inhibiteur des canaux mitoK<sub>ATP</sub> (5-HD) aboli partiellement l'effet protecteur du desflurane chez le chien après une occlusion de l'IVA. Tanaka et al.<sup>21</sup> ont confirmé le rôle des canaux mitoK<sub>ATP</sub> dans l'APC par l'isoflurane et que leur activation était ROS-dépendante.

Il a été décrit, de manière isolée, la participation de certains facteurs de transcription, comme le complexe NF $\kappa$ B<sup>57</sup> et HIF1 $\alpha$ <sup>58</sup>, de la voie Pi3K/Akt<sup>59</sup> et de MAPK<sup>60</sup>, les récepteurs adénosines et adrénérgiques<sup>61</sup>.

En l'état actuel des connaissances, aucun mécanisme décrit fait consensus en dehors du rôle des ROS qui se comporteraient comme des initiateurs des voies de signalisation et des effecteurs intracellulaires responsables de l'effet cardioprotecteur de l'APC par les agents anesthésiques volatiles<sup>19 20 21 22 23 24 25</sup>. Il semble très probable que les agents anesthésiques soient capables d'induire plusieurs voies de signalisation et plusieurs effecteurs dont l'effet global soit cardioprotecteur de manière synergique.

## VII. L'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)

### A. Généralités

L'ensemble du monde vivant a développé des mécanismes nécessaires à son adaptation métabolique en réponse à des stress énergétiques tels que le déficit en apport énergétique (déficit en glucose, en acides aminés, en oxygène...) et/ou l'augmentation en demande énergétique (croissance, exercice...). Parmi les moyens d'adaptation, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK : AMP-activated protein Kinase) figure comme le senseur central du métabolisme énergétique cellulaire permettant une régulation fine des besoins et disponibilités en énergie intracellulaire <sup>26 62</sup>.

### B. Structure et régulation de l'AMPK

L'AMPK est une protéine ubiquitaire et abondante présente sous la forme d'un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique  $\alpha$ , et deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ , dont chacune est représentée par différentes isoformes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) codées par des gènes distincts. Les variations des profils d'expression, qui sont tissu dépendant, procurent des propriétés tissus spécifiques, à l'image de l'hétérotrimère  $\alpha 2\beta 2\gamma 3$  qui est la forme majoritaire dans le muscle squelettique, dont les rôles sont encore peu connus <sup>63</sup>.

L'activité du complexe hétérotrimérique de l'AMPK est contrôlée de manière extrêmement sensible et complexe en réponse à de faibles variations des concentrations en AMP et ATP. Tout d'abord, l'activité de l'AMPK est modulée de façon allostérique par l'AMP (activation) et l'ATP (inhibition) de manière compétitive. La liaison de AMP favorise la phosphorylation de l'AMPK au niveau de son résidu Thr<sup>172</sup> (thréonine 172) dont la présence est essentielle pour assurer l'activation de l'AMPK. La liaison de l'AMP protège également l'AMPK de la déphosphorylation par les protéines phosphatases.

Trois protéines kinases capables de phosphoryler et d'activer l'AMPK ont été identifiées : il s'agit de la protéine kinase suppresseur de tumeur LKB1 (Liver Kinase B1) <sup>64</sup>, la protéine kinase CaMKK $\beta$  (Calcium/CalModuline-dépendant protein Kinase Kinase 2) <sup>65</sup> et la protéine kinase TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$  Activated Kinase 1) <sup>66</sup>.

La protéine LKB1 ne répond pas aux variations du rapport AMP/ATP et semble être constitutivement active. Mais c'est la liaison de l'AMP au complexe AMPK qui permettrait d'expliquer l'activation de l'AMPK par LKB1, en modifiant la structure de l'AMPK et en permettant l'accessibilité du résidu Thr<sup>172</sup> à LKB1.



Les mécanismes d'activation de l'AMPK par la CaMKK $\beta$  et par la TAK1 restent encore à éclaircir. Il a été décrit très récemment une phosphorylation activatrice de TAK1 par les ROS, induisant une activation de l'AMPK<sup>67</sup>.

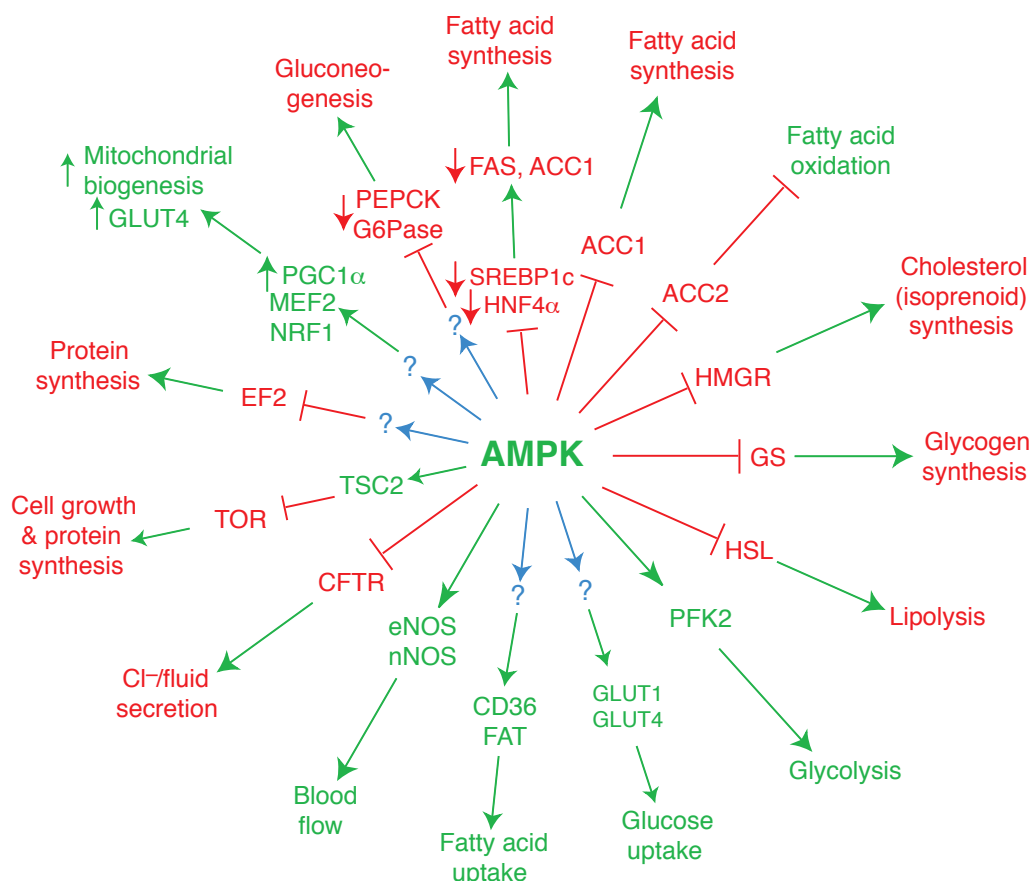
### C. Fonction de l'AMPK

Chez les mammifères, les cellules doivent maintenir une balance énergétique positive et stable, caractérisé par un rapport ATP/ADP élevé (10/1). Lorsque la balance énergétique est perturbée par un stress (déprivation en glucose, hypoxie, ischémie), la concentration d'ATP chute, le rapport ATP/AMP augmente par l'intermédiaire de l'adénylate kinase et ainsi l'AMPK devient active.

Une fois activée, l'AMPK participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en stimulant les voies cataboliques impliquées dans la synthèse de l'ATP (oxydation des acides gras, glycolyse) et inhibant les voies anaboliques ou consommatrices d'ATP (synthèse protéique, de cholestérol et d'acides gras). Ce système de senseur énergétique du métabolisme énergétique constitue un mécanisme de survie cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes<sup>26 62</sup>.

Parmi les effets induits par l'activation de l'AMPK, on retrouve (Figure 11):

- Une inhibition de la synthèse d'acide gras par une phosphorylation inhibitrice de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui est l'enzyme initiatrice du métabolisme lipidique<sup>68</sup>.
- Une stimulation de la glycolyse par une translocation de GLUT4 à la membrane<sup>69</sup> et une phosphorylation activatrice de PFK1 qui est une enzyme limitante de la glycolyse<sup>70</sup>.
- Un arrêt de la croissance et de la prolifération cellulaire qui sont des processus extrêmement consommateurs d'énergie, par l'inhibition de la voie du complexe mTOR et de ses cibles (p70S6K, S6K, 4EBP1...) <sup>71 72</sup>.
- Une induction de l'autophagie par l'inhibition du complexe mTOR<sup>73</sup>.



**Figure 11 : LES FONCTIONS DE L'AMPK (Hardie DG, J Cell Sci, 2004) <sup>62</sup>**

Les flèches textuelles en vert représentent les processus activés par l'AMPK et en rouge ceux inhibés par l'AMPK

#### D. Activateurs et inhibiteurs de l'AMPK

L'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside) est métabolisé dans la cellule en ZMP (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl monophosphate) qui est un analogue de l'AMP. Ainsi le ZMP fonctionne comme l'AMP endogène en permettant l'activation de l'AMPK. Par ailleurs, AICAR n'est pas un activateur sélectif puisqu'il peut activer les autres enzymes sensibles à l'AMP, tel que la glycogène phosphorylase.

La metformine (N,N-diméthylimidocarbonimidic diamide) est un anti-diabétique oral communément prescrit pour le traitement du diabète de type 2. Elle induit une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK facilitant l'import du glucose intracellulaire par translocation du GLUT4. Le mécanisme d'activation de l'AMPK reste encore controversé, bien qu'une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électron mitochondriale semble être impliquée <sup>74</sup>.

Le compound C et la dorsomorphin sont des inhibiteurs non spécifiques de l'AMPK dont les mécanismes sont mal connus. De plus leurs effets inhibiteurs sont absents lors de certains stimuli activateurs de l'AMPK.

## ETUDE

---

## OBJECTIFS & PLAN DE L'ETUDE

---

### I. Objectif de l'étude

#### Objectif principal :

Mettre en évidence le rôle de l'AMPK dans les voies de signalisation du préconditionnement anesthésique par le sévoflurane sur modèle cellulaire de cardiomyocyte.

#### Objectifs secondaires :

- Montrer le caractère dépendant des ROS de l'activation de l'AMPK par le sévoflurane.
- Evaluer la pertinence des protéines anti-apoptotiques comme des effecteurs en aval de l'activation de l'AMPK, responsable de l'effet protecteur de l'APC par le sévoflurane en situation d'IR.

### II. Plan de l'étude

La réalisation des objectifs de l'étude a nécessité plusieurs étapes :

- Mise en place d'un modèle in vitro d'IR dans des cultures de cardiomyoblastes de rat.
- Mise au point d'un modèle in vitro d'APC par le sévoflurane dans des cultures de cardiomyoblastes de rat en situation d'IR.
- Etude de la voie de signalisation de l'AMPK en réponse à une exposition au sévoflurane, aux inducteurs de ROS et aux inhibiteurs de ROS.

## MATERIEL ET METHODE

---

### I. Produits

Le sévoflurane a été acheté chez Baxter®, la roténone a été achetée chez Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich® France), le MnTBAP a été acheté chez Santa Cruz (Santa-Cruz®, France), les milieux de culture DMEM, le PBS et la trypsine-EDTA 0,25% ont été obtenus chez Invitrogen (Life Technologies, France). Les autres réactifs ont été obtenus chez Euromedex (Euromedex, France) et Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich® France). Les anticorps de chez Cell Signaling ont été achetés chez Ozyme France et les anticorps de chez santa-cruz ont été achetés chez Santa-Cruz Biotechnology, France. Les substrats DEVD-AMO et DEVD-CHO pour le dosage de l'activité caspase 3 ont été obtenus chez Enzo Life Sciences, France.

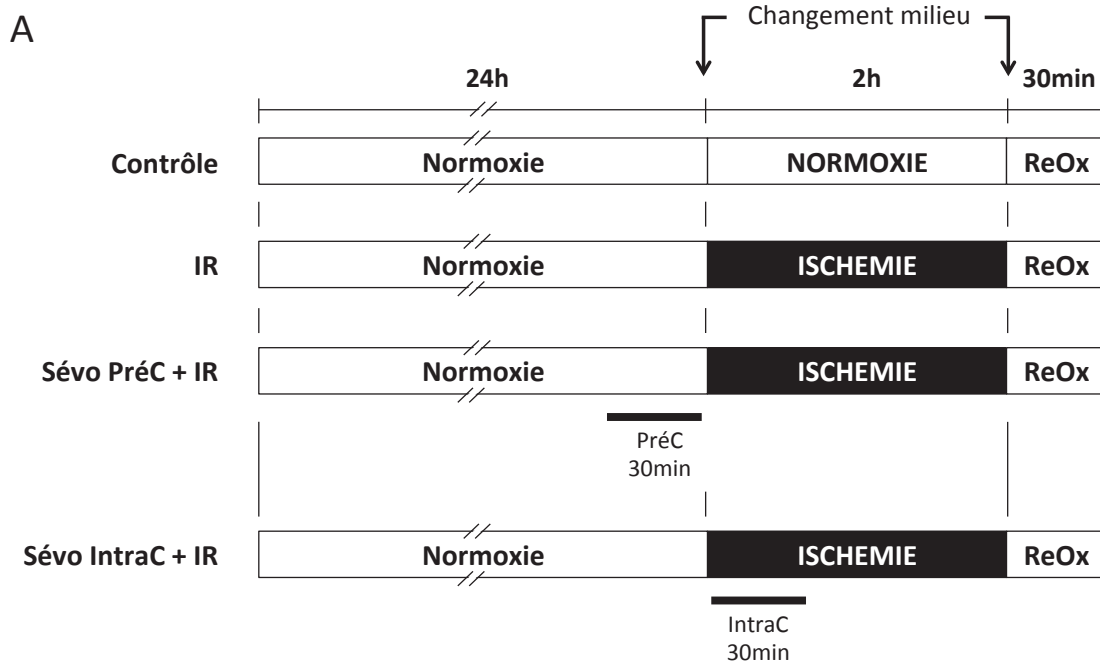
### II. Culture cellulaire

Les cellules H9c2 sont des cardiomyoblastes d'embryon de rat obtenues auprès de l'ATCC <sup>75</sup>. Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco®) avec 5,5mM de D-glucose, 1mM de Pyruvate de sodium, 10% de sérum de veau foetal (FBS), 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, et incubées dans un environnement à 95% d'air ambiant, 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C. Quand les cellules ont atteint une confluence de 50%, elles sont réensemencées après avoir été mises en suspension avec Trypsine-EDTA 0,25% (Gibco®). Pour toutes les expériences, les cellules ont été ensemencées dans des flacons de culture de 25cm<sup>2</sup> munis d'un bouchon avec filtre 0,2µm, à une densité de 6000 cellules par cm<sup>2</sup>. Après 3 jours, le milieu de culture est renouvelé, et après 4 jours, les cellules ont atteint la confluence permettant la réalisation des expériences.

### III. Simulation des lésions d'IR myocardique

Pour étudier les mécanismes de l'APC par le sévoflurane vis-à-vis de l'IR myocardique, nous avons mis au point un modèle in vitro reproduisant les lésions d'IR (Figure 1A). Quand les cellules H9c2 ont atteint la confluence, elles sont placées dans une enceinte hypoxique (Figure 1B) à 94.9% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 0.1% O<sub>2</sub> (Don Whitley Scientific® Hypoxystation H35), elles sont rincées deux fois avec du PBS-Calcium-Magnésium pré-incubé puis elles sont mis en culture avec un milieu pré-incubé mimant l'ischémie (125mM NaCl ; 8mM KCl ; 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,25mM MgSO<sub>4</sub> ; 1,2mM CaCl<sub>2</sub> ; 6,25mM NaHCO<sub>3</sub> ; 5mM sodium lactate ; 20mM HEPES ; pH 6,6 ajusté par NaOH). Après 2h d'ischémie simulée, les lésions de reperfusion

sont induites par un remplacement du milieu de culture par un milieu normoxique Krebs-Henseleit pré-incubé (110mM NaCl ; 4,7mM KCl ; 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,25mM MgSO<sub>4</sub> ; 1.2mM CaCl<sub>2</sub> ; 25mM NaHCO<sub>3</sub> ; 11mM D-glucose ; 20mM HEPES ; pH 7,4 ajusté par NaOH) et une incubation des cellules à 95% d'air ambiant, 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C pendant 30 minutes. Les conditions contrôles ont été incubées pendant les mêmes durées avec un milieu normoxique Krebs-Henseleit.



**B**

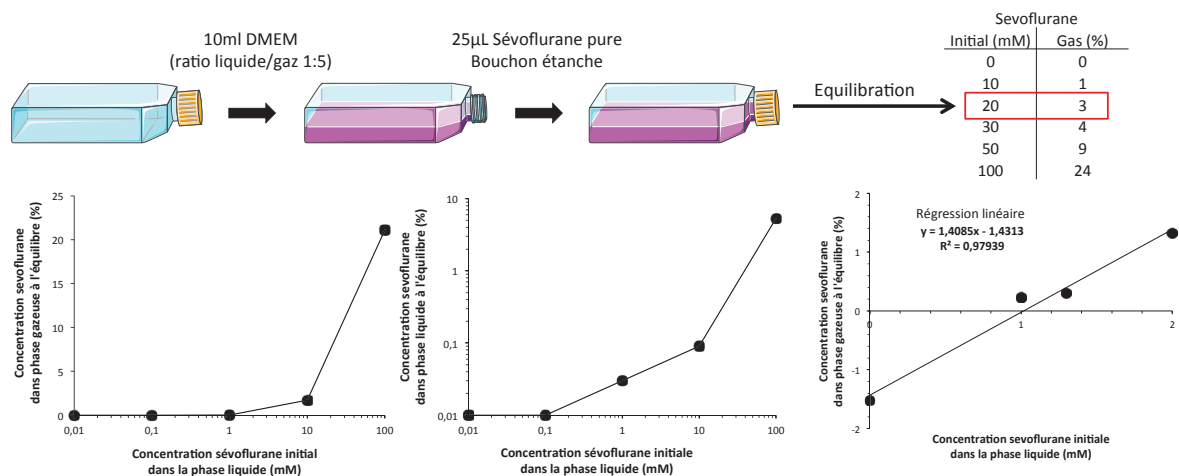


**Figure 1 : DESCRIPTION DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL D'ISCHEMIE-REPERFUSION**

A : l'ischémie est mimée par l'utilisation d'un milieu sans substrat énergétique, acide pH6.6, riche en potassium dans un environnement anoxique à 0,1%. La reperfusion (RéOx) est mimée par l'utilisation d'un milieu glucosé à pH7.4 dans un environnement normoxique à 20%. B : enceinte hypoxique Hypoxystation H35 (Don Whitley Scientific®). IR, ischémie-reperfusion ; Sévo, sévoflurane ; Préc, préconditionnement ; IntraC, intraconditionnement ; ReOx, réoxygénation mimant la reperfusion.

## IV. Préconditionnement anesthésique

L'APC a été réalisé par l'ajout du sévoflurane, provenant de la solution stock pure (Baxter®), directement dans le milieu de culture à une concentration initiale de 20mM comme décrit par Zitta et al.<sup>76</sup> Après ajout du sévoflurane, les flacons de culture cellulaire sont fermés hermétiquement par un bouchon sans filtre pour éviter l'évaporation de l'agent anesthésique. Il en résulte une rapide équilibration entre la phase gazeuse et la phase liquide à approximativement 0,4mM et 3% respectivement, si le rapport volume liquide/gaz est de 1:5 (soit un volume de milieu de 10mL pour un flacon T25) (Figure 2). L'APC est terminé soit par un remplacement du milieu de culture, soit par une ouverture du bouchon permettant l'évaporation du sévoflurane. L'APC est appliqué selon 2 méthodes : (1) Préconditionnement où l'agent anesthésique est introduit avant l'ischémie pendant une durée de 30 minutes, (2) Intraconditionnement où le sévoflurane est ajouté au début de l'ischémie et maintenu pendant les 30 premières minutes (Figure 1).



**Figure 2 : DESCRIPTION DU PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL D'EXPOSITION AU SÉVOFLURANE MISE AU POINT PAR ZITTA ET AL**

Après l'ajout du sévoflurane directement au milieu de culture, l'équilibre entre la phase liquide et gazeuse est très rapidement atteint dans un système clos. Les graphiques représentent les valeurs mesurées par chromatographie dans les phases liquides et gazeuses après équilibration. Le tableau présente la corrélation entre les concentrations de sévoflurane dans la phase gazeuse après équilibration et dans la phase liquide initialement calculée à partir de la régression linéaire log-log. Une concentration initiale de 20mM (25µL) correspond à une concentration d'approximativement 3% en phase gazeuse après équilibration, ce qui correspond à des concentrations cliniques.

## V. Fractionnement subcellulaire

Pour mesurer la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol, nous avons utilisés le Kit d'extraction ProteoExtract subcellular Proteome (ref 539790, Calbiochem®) selon les instructions du fabricant. Les cellules sont rincées une fois avec du PBS sans calcium puis mises en suspension avec Trypsine-EDTA 0,25% (Gibco®) pendant 3 minutes (neutraliser par du DMEM à 10%FBS). Pour obtenir une quantité suffisante de protéines, 3 flacons de 25cm<sup>2</sup> ont été groupés. Après la mise en suspension, toutes les étapes de l'extraction sont réalisées dans la glace ou à +4°C. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid sans calcium et une fois avec du « Wash buffer » froid, puis séparées par une centrifugation à 200g pendant 10 minutes. La fraction cytosolique (Fraction 1) est obtenue après une incubation de 10 minutes avec 100µL d'« Extraction Buffer 1 » avec des inhibiteurs de protéase, suivie d'une centrifugation à 800g pendant 10 minutes. Au décours, le culot est rincé une fois avec d'« Extraction Buffer 1 » puis il est incubé avec 100µL de « Extraction Buffer 2 » avec des inhibiteurs de protéase, suivie d'une centrifugation à 5500g pendant 10 minutes afin d'obtenir la fraction mitochondriale (Fraction 2). Les échantillons sont conservés à -20°C.

## VI. Extraction protéique totale

Pour évaluer la quantité des protéines cellulaires, après un rinçage au PBS-calcium-magnésium froid, les cellules sont lysées par 100µL de tampon Laemmli 1,5X (150mM Tris-HCl pH 6,8 ; 3,75% SDS ; 30% Glycérol) puis grattées directement dans le flacon 25cm<sup>2</sup>. Les échantillons sont conservés à -20°C.

## VII. Dosage de l'activité caspase 3

Pour le dosage de l'activité de la caspase 3, après un rinçage au PBS froid sans calcium, les cellules sont lysées par 100µL de tampon de lyse caspase (150mM NaCl ; 50mM HEPES-NaOH pH7,5 ; 20mM EDTA ; 0,2% NP40 ; inhibiteurs de protéase) puis grattées directement dans le flacon 25cm<sup>2</sup>. Après incubation pendant 10 minutes sur la glace, les lysats cellulaires sont centrifugés à 16000g pendant 10 minutes à +4°C. Le surnageant est récupéré et conservé à -20°C. Après un dosage BCA, les échantillons protéiques de 20µg en triplicata dans 50µL de tampon caspase (150mM NaCl ; 50mM HEPES-NaOH pH7,5 ; 20mM EDTA) sont déposés dans une plaque noire 96 puits. Au dernier moment, 50µL de réactif (47,5µL tampon caspase, 2µL DEVD-AMC 10mM, 0,5µL DTT 1M) est ajouté à chaque échantillon protéique, puis analysé par fluorimétrie (fluoroskan Ascent™,



Thermo Scientific) (Ex 390nm, Em 460nm, cinétique : 30 mesures espacées de 5 minutes).

### **VIII. Western blot**

A partir des extraits protéiques, la quantité de protéine est mesurée par spectrométrie à 562nm selon la méthode BCA (Pierce®, BCA Protein Assay Kit). Les échantillons protéiques sont préparés avec 10µg de protéines (pour le fractionnement subcellulaire) ou avec 40µg de protéines (pour l'extraction totale) de protéines dilués dans 30µl de tampon Laemmli, additionné de 10µl de TR12 (62,5mM TRIS pH 6,8 ; 20% glycérol ; 2% SDS ; 0,25% bleu de bromophénol ; 3% β-mercaptoéthanol) et dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. L'ensemble des protéines est séparé dans un gel dénaturant par électrophorèse (SDS-PAGE) de 7,5 à 15% de polyacrylamide puis transféré sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène). Après saturation des sites non spécifiques dans une solution de blocage (10mM TRIS pH 7,4 ; 150mM NaCl ; 1mM EDTA ; 0,1% Tween-20 ; 3% BSA ; 0,5% gélatine) pendant au moins 1 heure, la membrane est incubée à +4°C toute la nuit avec les anticorps primaires de la protéine d'intérêt (Tableau 1). Après trois rinçages, la membrane est alors incubée à température ambiante pendant 1h avec l'anticorps secondaire adapté couplé à une enzyme HRP (peroxydase de raifort). Après trois rinçages, l'anticorps secondaire est révélé par chimioluminescence ECL (Enhanced ChimioLuminescence) secondaire à l'ajout d'un agent lumineux, le luminol (Pierce®, ECL Western Blotting Substrate). Les protéines Actine, Erk2 et HSP90 sont utilisées comme contrôle de charge. La quantification de la densité optique a été réalisée avec le logiciel image-J.

### **IX. Mesure de la masse mitochondriale**

Pour évaluer la masse mitochondriale, les cellules H9c2 sont incubées pendant 10 minutes avec une sonde fluorescente MitoTracker® green FM à 1µM (Molecular Probes®) émettant à 516nm après une excitation à 490nm et qui marque les lipides de la membrane mitochondriale indépendamment du potentiel mitochondrial. Les cellules sont mises en suspension avec Trypsine-EDTA 0,25% (Gibco®) pendant 3 minutes (neutraliser par du DMEM à 10%FBS). Puis, après un rinçage avec du PBS froid sans calcium, les cellules sont resuspendues dans 500µL de PBS froid sans calcium. Les cellules sont alors immédiatement analysées en cytométrie en flux (MACSQuant® Analyzer, Miltenyi).

## X. Anticorps utilisés en western blot

Anticorps primaires				
Protéine d'intérêt	Espèce d'origine	Dilution	Fournisseur	Référence
ACC total	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS3676
Actine	Chèvre	WB: 1/1000e	Santa Cruz	SC-1616
AMPK total	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS2532
Bcl-2	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS2870
Bcl-xL	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS2764
COX IV	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS4844
Cytochrome c	lapin	WB: 1/1000 <sup>e</sup>	Cell Signaling	CS3810
Enolase	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS4280
ERK2	souris	WB: 1/1000e	Santa Cruz	SC-1647
HSP60	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS4870
HSP90	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS4877
p70S6K total	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS9202
pan-Caspase 3	lapin	WB: 1/1000 <sup>e</sup>	Cell Signaling	CS9662
phospho-ACC	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS3661
phospho-AMPK	lapin	WB: 1/1000e	Cell Signaling	CS2535
phosphop70S6K	lapin	WB: 1/1000 <sup>e</sup>	Cell Signaling	CS9234

Anticorps secondaires couplés HRP pour WB				
Espèce reconnue	Espèce d'origine	Dilution	Fournisseur	Référence
Lapin	Chèvre	1/5000 <sup>e</sup>	Cell Signaling	CS7074
Souris	Chèvre	1/3000 <sup>e</sup>	Dako	Z0420
Chèvre	Lapin	1/3000e	Dako	P0160

**Tableau 1 : ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISÉS POUR LES WESTERN BLOTS**

## XI. Analyse statistique

Toutes les valeurs ont été exprimées comme la moyenne  $\pm$  erreur standard (SEM). Pour les variables quantitatives gaussiennes, la différence significative entre les moyennes a été déterminée par le modèle linéaire général en utilisant la régression linéaire ou l'analyse de la variance à une ou plusieurs variables (ANOVA) suivie d'un test de TukeyHSD (test Post-Hoc), comparé à un test de Fisher, si nécessaire. Pour les variables suivant une loi binomiale (variable de proportion [0,1]), les comparaisons de moyennes ont été déterminées par le modèle linéaire généralisé GLM en utilisant l'analyse de la variance à une ou plusieurs variables (ANOVA) suivie d'un test équivalent TukeyHSD, comparé à un test de Chi<sup>2</sup>, si nécessaire. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le Logiciel R (R Project for statistical Computing). Une valeur de p inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

## RESULTATS

---

### I. Mise au point du modèle d'IR et APC

Avant la mise au point du modèle d'IR, nous avons tout d'abord vérifié la qualité de notre fractionnement subcellulaire (Figure 3A) et confirmé l'absence de cytotoxicité du sévoflurane sur les cellules H9c2 en dehors de tout stress énergétique par l'absence de mise en jeu des mécanismes apoptotiques : absence d'induction de la libération du cytochrome c (Figure 3B) et de clivage de la procaspase 3 en caspase 3 active (Figure 3C).

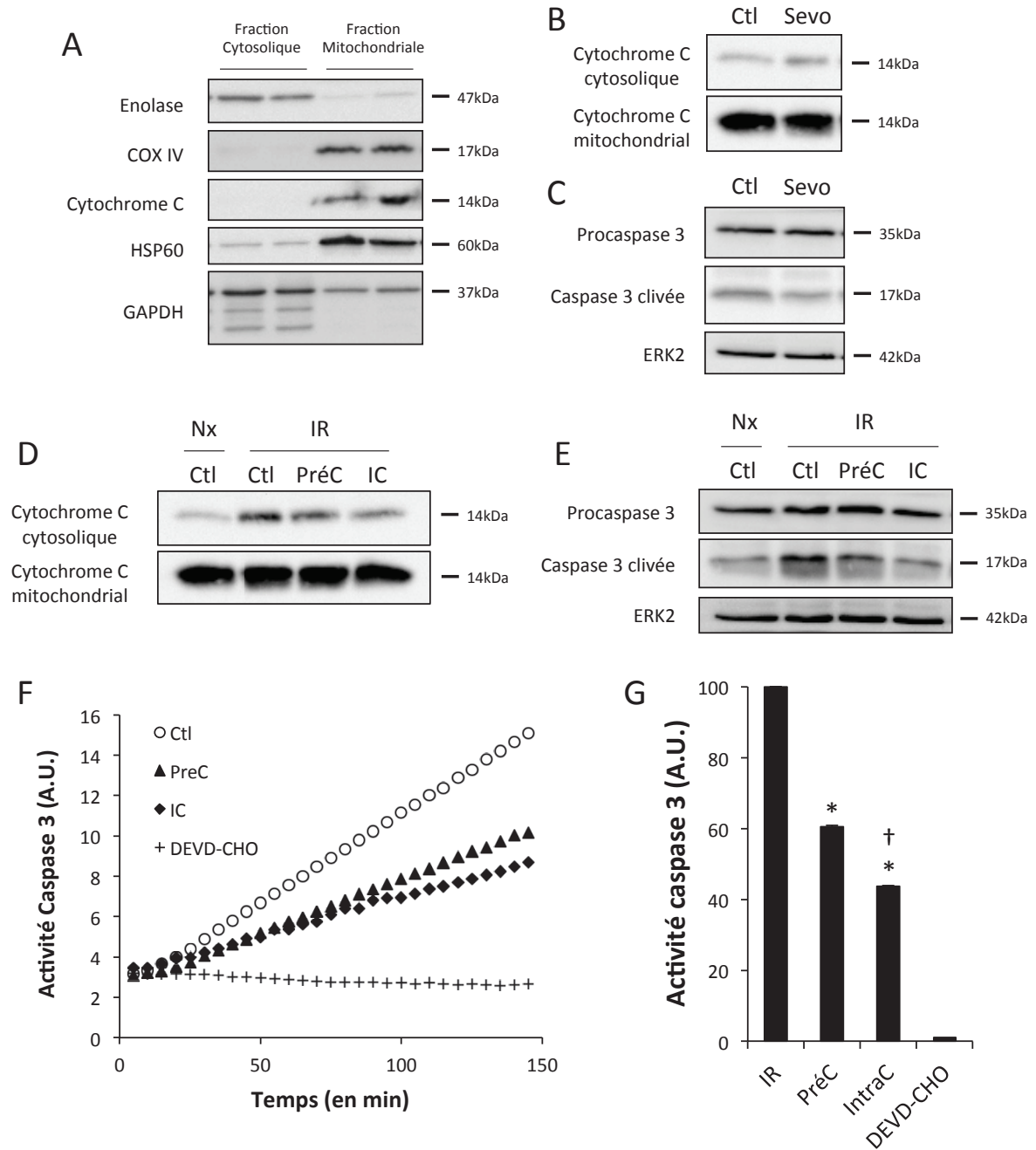
Ensuite, nous avons montré la capacité de notre modèle in vitro d'IR de mimer les lésions induites par l'IR de type apoptotique avec une forte libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol (Figure 3D) et un clivage de la procaspase 3 en caspase 3 (Figure 3E).

Après un préconditionnement au sévoflurane (selon le protocole défini dans le Matériel et Méthode), notre modèle montre un effet protecteur vis-à-vis des mécanismes apoptotiques induits par l'IR avec une diminution de la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol (Figure 3D) et une diminution du clivage de la procaspase 3 en caspase 3 (Figure 3E) responsable d'une diminution de 40% de l'activité caspase 3 active (Figure 3F-G).

Cet effet encore plus marqué lors d'un intraconditionnement (voir Figure 1, Matériel et Méthode) par le sévoflurane débuté au début de l'ischémie (Figure 3D-G).

Donc nous avons mis au point un modèle in vitro d'APC sur des cardiomyoblastes de rat capable de protéger des lésions induites par IR.

Ces premiers résultats ont permis la mise au point d'un modèle valide in vitro d'APC sur des cardiomyoblastes de rat, capable de protéger des lésions induites par IR.



**Figure 3 : L'APC PAR LE SÉVOFLURANE PROTEGE LES CARDIOMYOCYTES DE LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE EN SITUATION D'IR.**

A : Validation de la méthode de fractionnement sub-cellulaire. Les protéines COX IV, cytochrome c et HSP60 sont localisées dans la mitochondrie en condition normale. Les protéines émolase et GAPDH sont majoritairement présentes dans le cytosol en condition normale. B et C : Vérification de l'absence de cytotoxicité du Sévoflurane en condition normale. D et E : L'IR induit l'apoptose par libération du cytochrome c vers le cytosol après la MOMP et donc un clivage de la procaspase 3 en caspase 3 par l'apoptosome. L'APC protège de l'apoptose en diminuant la libération du cytochrome c et le clivage de la procaspase 3. F et G : L'effet protecteur de l'APC est confirmée par une diminution de l'activité de la caspase 3 au décours d'une IR. La vitesse de la réaction (coefficient de la pente) est quantifiée et normalisée à la condition IR sans APC (contrôle). DEVD-CHO : inhibiteur de la caspase 3. (Valeur  $p < 0,05$  ; \* par rapport à IR ; † par rapport à PréC)

## **II. Activation de la voie de signalisation de l'AMPK par le sévoflurane de manière ROS dépendante**

### **A. Le Sévoflurane active l'AMPK par phosphorylation**

Nous avons étudié l'effet du sévoflurane sur l'état de phosphorylation de l'AMPK en dehors de tout stress énergétique (connu pour activer la voie de l'AMPK). Nous avons mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK de manière dose dépendante après 1h d'exposition au sévoflurane (Figure 4A) et cette induction de la phosphorylation de l'AMPK est rapide et transitoire malgré le maintien de l'exposition au sévoflurane (Figure 4B).

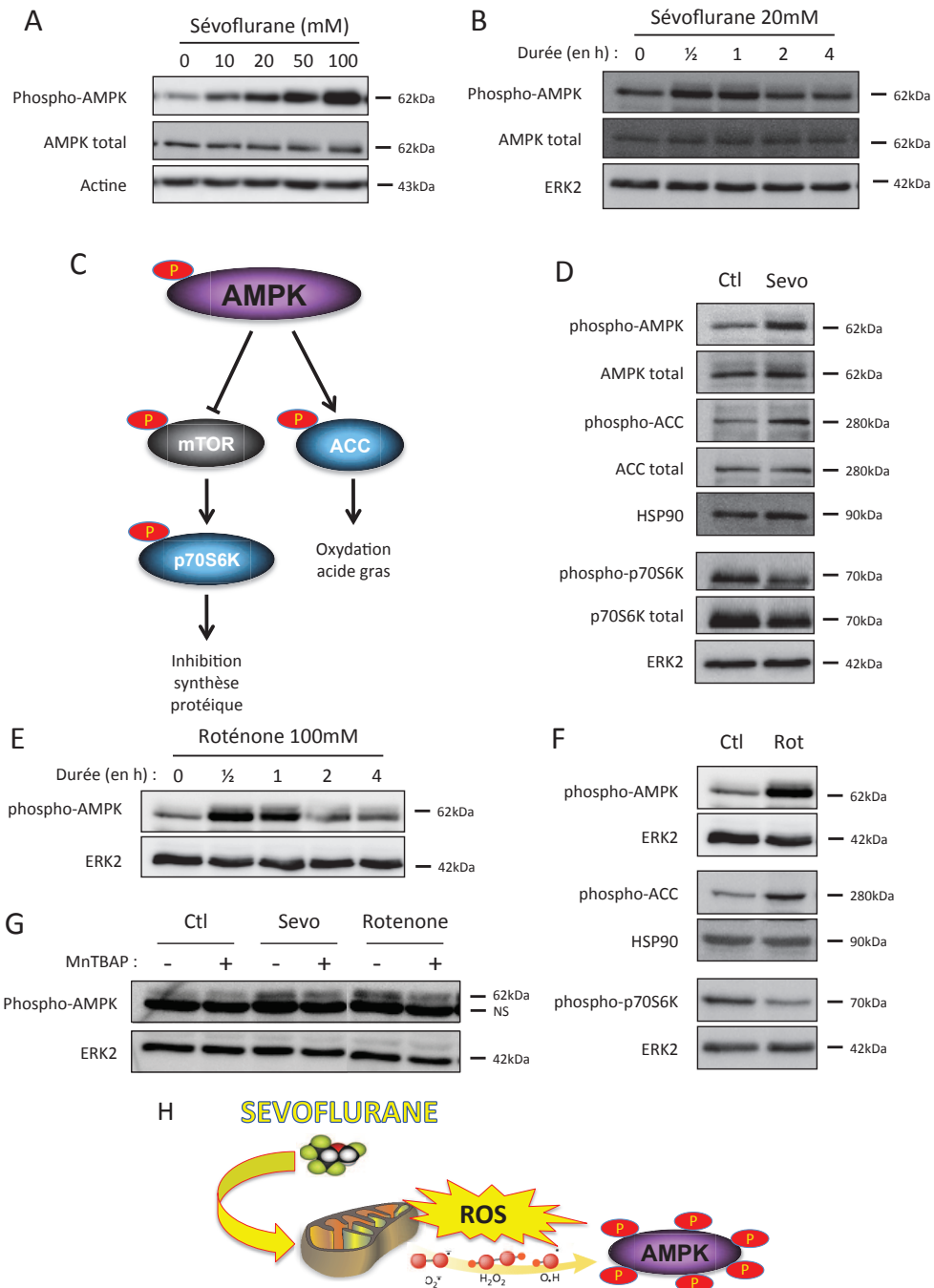
Nous avons également montré que la phosphorylation de l'AMPK est efficace avec une activation de ses cibles (Figure 4C) telle qu'une augmentation de la phosphorylation de ACC et une déphosphorylation de p70S6K par l'intermédiaire d'une phosphorylation inhibitrice du complexe mTOR (Figure 4D).

### **B. L'activation de l'AMPK par le Sévoflurane est dépendant des ROS**

Pour vérifier l'implication des ROS dans le mécanisme d'activation de la voie de l'AMPK par le sévoflurane, nous avons tout d'abord utilisé un inducteur des ROS, la roténone qui entraîne une production de ROS par une inhibition de l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électron de la mitochondrie. Nous avons reproduit les mêmes expériences en substituant le sévoflurane par la roténone, et nous avons observé les mêmes effets de la roténone avec une phosphorylation rapide et transitoire de l'AMPK (Figure 4E) et de ses cibles ACC et p70S6K (Figure 4F).

Pour confirmer le rôle des ROS dans l'induction de l'AMPK par le sévoflurane, nous avons utilisé un ROS scavenger, le MnTBAP qui mime l'action de la superoxyde dismutase (SOD) et qui est un scavenger des peroxy-nitrites. Nous avons montré que le MnTBAP inhibe la phosphorylation de l'AMPK par le Sévoflurane et par la Roténone (Figure 4G).

Ainsi, nos résultats montrent que le sévoflurane induit une phosphorylation transitoire et efficace de la voie de signalisation de l'AMPK de manière ROS dépendante (Figure 4H)..



**Figure 4 : LE SEVOFLURANE INDUIT UNE ACTIVATION DE LA VOIE DE L'AMPK DE MANIERE ROS-DEPENDANTE.**

A : le sévoflurane induit une phosphorylation de l'AMPK sur Thr<sup>172</sup> de manière dose-dépendante après 1h d'exposition. B : La phosphorylation de l'AMPK induite par le sévoflurane est rapide et transitoire malgré la maintien de l'exposition. C : représentation de 2 cibles de l'AMPK, ACC qui est phosphorylé directement par l'AMPK et p70S6K qui est déphosphorylée lorsque l'AMPK est active par une phosphorylation inhibitrice du complexe mTOR. D : La phosphorylation de l'AMPK induite par 20mM de sévoflurane pendant 30minutes est efficace avec une modification de l'état de phosphorylation de ses cibles ACC et p70S6K. E : la rotenone est un activateur de la production de ROS. Les ROS induisent une phosphorylation rapide et transitoire de l'AMPK, similaire au Sévoflurane. F : La phosphorylation de l'AMPK induite par les ROS, 100mM pendant 30minutes est efficace avec une modification de l'état de phosphorylation de ses cibles ACC et p70S6K. G : Les ROS scavengers, MnTBAP à 100µM, inhibent la phosphorylation de l'AMPK par le Sévoflurane 20mM et les ROS (Roténone 10µM). H : modèle proposé de l'activation de la voie de l'AMPK par le Sévoflurane.

### **III. Bcl-xL comme effecteur potentiel de l'effet protecteur du sévoflurane**

#### **A. L'APC permet de limiter l'apoptose induite par l'IR**

En réponse à un signal de mort (tel que l'IR), les mitochondries sont perméabilisées libérant ainsi le cytochrome c qui est responsable de l'induction de l'apoptose. Les mitochondries altérées sont alors éliminées par l'autophagie ou la mitophagie.

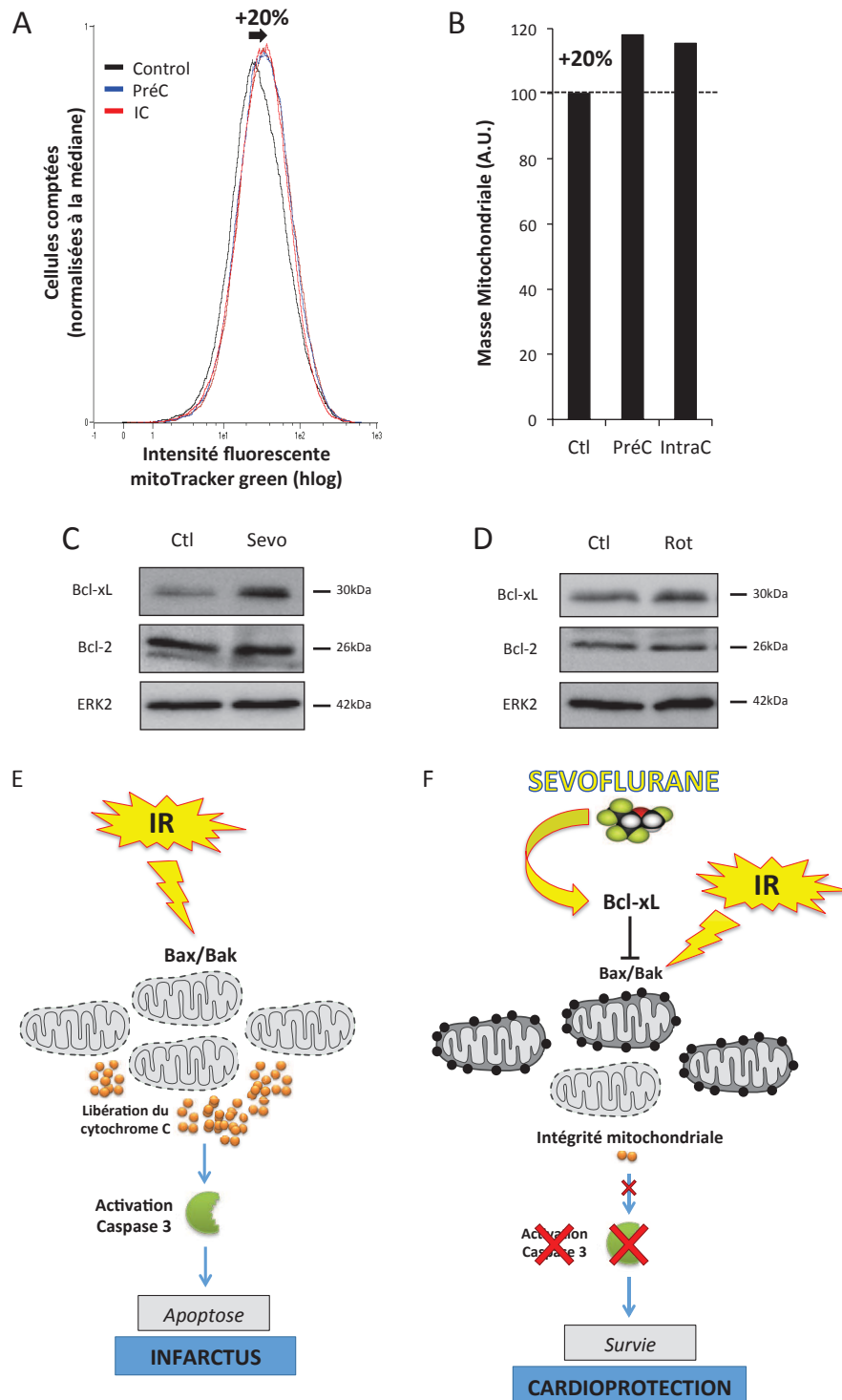
Nous avons étudié la masse mitochondriale au décours d'une IR avec et sans APC. Nous avons mis en évidence une limitation de la diminution de la masse mitochondriale de plus de 20% après une IR avec APC par rapport à une IR sans APC (Figure 5A-B). Ceci suggère que l'APC limite la perméabilisation des mitochondries et donc leur élimination en réponse à l'IR.

#### **B. L'APC par le Sévoflurane induit une expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL**

Parmi les effecteurs connus limitant la perméabilisation des mitochondries et inhibant l'apoptose, nous avons étudié les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Nous avons montré une induction de la protéine Bcl-xL par le sévoflurane (Figure 5C) et par la Roténone (inducteur de ROS) en dehors de tout stress (Figure 5D).

Donc l'ensemble de nos expériences montrent une corrélation entre la diminution de la perméabilisation des mitochondries (diminution de la libération du cytochrome c), une limitation de la diminution de la masse mitochondriale et une induction de Bcl-xL par l'APC, suggérant un rôle potentiel de Bcl-xL comme effecteur de l'effet protecteur de l'APC par le sévoflurane (Figure 5E-F).

Cette dernière série de résultats permet de suggérer qu'en situation d'IR, l'APC par le sévoflurane pourrait protéger de la mort cellulaire par apoptose, en inhibant l'activation de Bax-Bak et la perméabilisation mitochondriale par l'induction de Bcl-xL.



**Figure 5 : BCL-XL, INDUIT PAR LE SEVOFLURANE, EST UN POTENTIEL EFFECTEUR DE L'EFFET ANTI-APOPTOTIQUE DE L'APC**

A et B : Le Préconditionnement et l'intraconditionnement anesthésiques augmentent la masse mitochondriale de 20% par rapport à l'IR sans APC mesurée par un marquage des lipides membranaires mitochondriaux (MitoTracker Green). C : Le sévoflurane 20mM pendant 1h induit une augmentation de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL mais pas de Bcl-2. D : Les ROS, induit par la roténone 100mM pendant 1h, augmente la quantité de protéine Bcl-xL, mais pas de Bcl-2. E : l'IR induit une activation de Bax-Bak qui est responsable d'une libération du cytochrome c vers le cytosol et de l'activation de l'apoptose par activation des caspase 3. F : APC par le sévoflurane pourrait protéger en induisant une augmentation de Bcl-xL qui inhibe l'activation de Bax-Bak et ainsi empêche la libération de cytochrome c et l'activation de l'apoptose, pour favoriser la survie cellulaire.



## DISCUSSION

---

Dans cette étude, nous avons mis au point un modèle *in vitro* permettant l'étude des mécanismes lésionnels de l'ischémie-reperfusion (IR) et du préconditionnement anesthésique par les agents anesthésiques volatiles (APC) dans des cellules cardiaques de rat. Ainsi nous avons démontré pour la première fois que le sévoflurane induisait par l'intermédiaire d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une activation de la voie de l'AMPK, qui est une voie de signalisation majeure dans le contrôle et la régulation du métabolisme cellulaire en situation de stress énergétique.

De plus, nous avons montré que l'APC induisait une augmentation de la masse mitochondriale en situation d'IR corrélée à une induction de la protéine Bcl-xL, connu pour son effet anti-apoptotique en inhibant la perméabilisation et l'altération des mitochondries en réponse à un signal de mort. Ainsi la protéine Bcl-xL représente une candidate pertinente comme effectrice de l'effet protecteur de l'APC vis-à-vis de l'IR.

Le choix du modèle cellulaire de cardiomyocytes de rats (lignée H9c2) est justifié par les travaux de Hescheler et al.<sup>75</sup> qui ont montré que les cellules embryonnaires H9c2 possèdent des caractéristiques morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques similaires aux cellules cardiaques adultes de rat et qu'elles représentent un modèle valide d'étude des cardiomyocytes, notamment pour l'étude de la transduction du signal.

La restriction qui peut être émise, d'un point de vue physiologique (et énergétique), concernant les cellules H9c2 est l'absence d'activité contractile spontanée qui est responsable d'une augmentation de la consommation d'énergie cellulaire, particulièrement en situation d'IR.

Afin de répondre à cette limite méthodologique, l'étape ultérieure de ce travail va consister à reproduire sur une autre lignée cellulaire de cardiomyocyte de souris ayant une activité contractile spontanée, les cellules HL-1 mise au point par Claycomb et al.<sup>77</sup>, mais également dans des cultures primaires de cardiomyocytes, les mêmes expériences.

Pour étudier les phénomènes d'IR, de nombreux auteurs ont utilisé des modèles de déprivation en oxygène seul<sup>78</sup> ou de déprivation en oxygène et glucose<sup>79</sup>, négligeant le rôle joué par les substrats énergétiques secondaires et les autres anomalies électrolytiques observées lors de l'ischémie.

Nous avons donc choisi un modèle *in vitro* d'IR associant une déprivation en oxygène et un milieu dépourvu de substrats énergétiques, acide à 6,6 de pH par l'ajout d'acide lactique à 5mM et riche en potassium à 8mM afin de reproduire l'environnement cellulaire durant une ischémie *in vivo*. Ce modèle est efficient et

mime les lésions d'IR avec une activation de l'apoptose par la libération du cytochrome c et le clivage de la procaspase 3 en caspase 3 active<sup>32 79 80</sup>.

Pour la réalisation de l'APC, la méthode référence est l'administration du sévoflurane par l'intermédiaire d'un vaporisateur associé à un analyseur de gaz, de manière similaire à la pratique clinique<sup>81</sup>. Compte-tenu de son faible coefficient de partage sang/gaz à 0,6 et eau/gaz à 0,37<sup>82</sup>; le sévoflurane s'équilibre rapidement entre les phases gazeuse et liquide à la concentration finale de 0,21mM dans la phase liquide par % en phase gazeuse (soit 0,4mM pour 2%)<sup>83</sup><sup>84</sup>. Malheureusement, cette technique n'est pas applicable dans nos conditions de culture, notamment en condition d'ischémie.

Une autre méthode d'administration du sévoflurane a été mise au point par Zitta et al.<sup>76</sup> pour la culture cellulaire, qui a été validé par rapport à la méthode référence. Cette technique consiste à ajouter directement le sévoflurane à la surface du milieu de culture dans un flacon fermé de manière étanche. Ainsi, les phases liquide et gazeuse s'équilibrent rapidement à des concentrations similaires à la méthode référence et à celles mesurées in vivo<sup>81 85 86</sup>.

Cette méthode autorise donc l'exposition de cellules (H9c2) au sévoflurane dans différentes conditions de culture sans la nécessité d'un vaporisateur et d'un analyseur de gaz.

En l'état actuel des connaissances, aucun mécanisme décrit fait consensus en dehors du rôle des ROS qui se comporteraient comme des initiateurs des voies de signalisation et des effecteurs intracellulaires responsables de l'effet cardioprotecteur de l'APC par les agents anesthésiques volatiles<sup>19 20 21 22 23 24 25</sup>.

Il semble très probable que les agents anesthésiques soient capables d'induire plusieurs voies de signalisation et plusieurs effecteurs dont l'effet global soit cardioprotecteur de manière synergique, tels que la PKC $\delta$ <sup>22 55</sup> et les canaux mitoK<sub>ATP</sub><sup>21 56</sup>.

Compte tenu de son rôle crucial dans les mécanismes de survie de la cellule en situation de stress énergétique, l'étude de l'implication de la voie de l'AMPK dans l'effet protecteur de l'APC est pertinent<sup>26 62</sup>.

Concernant le caractère ROS-dépendant de l'AMPK, il a été montré que l'AMPK peut être activée par différentes protéines, telle que LKB1, CaMKK2 et TAK1<sup>26 62</sup>. De plus, il a été montré que les ROS, telle que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sont capables d'activer l'AMPK par l'intermédiaire d'une phosphorylation de TAK1<sup>67</sup>.

Nos résultats sont donc en accord avec les données de la littérature car l'activation de l'AMPK par le sévoflurane est dépendante de la production de ROS, qui ont été montré comme des initiateurs indispensables de l'effet cardioprotecteur de l'APC dans de nombreuses études<sup>19 20 21 22 23 24 25</sup>.

Il reste à déterminer si les ROS, produits par le sévoflurane, activent directement l'AMPK par oxydation ou indirectement par l'intermédiaire d'une protéine activatrice de l'AMPK, comme TAK1.

Notre travail a montré pour la première fois une induction de la voie de l'AMPK ROS-dépendante par le sévoflurane en dehors de tout stress énergétique. Lamberts et al.<sup>87</sup> ont décrit sur des cœurs isolés de rat une implication de l'AMPK dans l'effet protecteur de l'APC : l'APC induisait une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK uniquement en situation d'IR. Lors de l'utilisation d'inhibiteur de l'AMPK (compound c) ou de ROS scavenger (MPG), l'effet protecteur de l'APC sur la taille de l'infarctus était partiellement aboli.

Ces données ont été mises en cause par Lotz et al.<sup>88</sup> qui ne retrouvaient pas d'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK par le desflurane sur un modèle *in vivo* de lapin ; néanmoins les résultats de ce travail étaient méthodologiquement discutables.

De plus bien que Zhao et al.<sup>89</sup> aient rapporté une activation de la voie de l'AMPK induite par le sévoflurane chez la souris, l'invalidation de l'activation de l'AMPK par l'utilisation de souris AMPK-DN (surexpression AMPK $\alpha_2$  dominant négatif, donc non active) n'a pas mis en évidence de réversion du préconditionnement ; en effet cela n'a pas entraîné de réduction de la taille de l'infarctus, de la libération de troponine I et de l'activité de la caspase 3 au décours d'une ischémie de 30 minutes.

Ainsi les données actuelles sur l'implication de l'AMPK dans l'effet protecteur de l'APC restent contradictoires et présentent une grande hétérogénéité méthodologique. Nos résultats apportent de nouveaux arguments en faveur du rôle de l'AMPK dans le préconditionnement anesthésique par les agents halogénés mais nécessitent d'être poursuivis.

Les perspectives que nous proposons pour renforcer les conclusions quant au rôle de l'AMPK reposent sur la réponse du modèle cellulaire après invalidation de l'AMPK. Cette invalidation sera réalisée par la génération de siRNA, shRNA et DN pour l'AMPK (expériences en cours).

La voie de signalisation de l'AMPK favorise la survie cellulaire et son implication dans le préconditionnement anesthésique semble pertinente. Plusieurs auteurs ont montré son implication dans l'autophagie et dans la mort cellulaire mais aucun lien n'a été encore souligné entre l'AMPK et l'induction des protéines de la famille Bcl-2, comme Bcl-xL.

En revanche, Raphael et al.<sup>90</sup> et Lu et al.<sup>24</sup> ont montré que l'APC produisait un effet anti-apoptotique en induisant une augmentation de la protéine anti-

apoptotique Bcl-2 respectivement par l'intermédiaire de la voie PI3K/Akt et la voie NF $\kappa$ B.

Donc notre hypothèse d'induction de Bcl-xL par l'intermédiaire de la voie de l'AMPK en réponse à l'APC doit être vérifiée par des méthodes de biologie moléculaire permettant l'inactivation de l'activation de l'AMPK et ainsi de l'induction de Bcl-xL en situation d'IR et d'APC par le sévoflurane.

L'étude des mécanismes du préconditionnement anesthésique par les agents volatiles est d'un intérêt majeur pour les patients pris en charge en anesthésie réanimation, notamment en chirurgie cardiaque et vasculaire où le pronostic des patients dépend directement de la prévention ou de la limitation des lésions induites par la chirurgie en elle-même. La compréhension des voies de signalisation et des effecteurs engagés dans l'effet protecteur de l'APC est une étape importante et nécessaire pour une meilleure prévention des lésions induites par l'IR, par le développement de nouvelles molécules pouvant agir directement sur ces voies de signalisation.

## CONCLUSION

Notre travail a montré pour la première fois une activation ROS-dépendante de la voie de l'AMPK par le sévoflurane dans un modèle *in vitro* de cardiomyoblastes de rat. Nous avons également identifié la protéine Bcl-xL comme un effecteur potentiel de l'effet anti-apoptotique de l'APC par le sévoflurane (Figure 6). Ces expériences devront être reproduites dans des cultures primaires de cardiomyocytes et chez l'animal pour confirmer l'implication de ce mécanisme dans l'effet protecteur de l'APC par les agents anesthésiques volatiles. A terme, l'utilisation de molécules agissant sur ces nouvelles cibles thérapeutiques, permettrait une optimisation de la prise en charge des patients en chirurgie cardiaque et vasculaire, et des patients à risque cardiovasculaire en chirurgie non cardiaque.

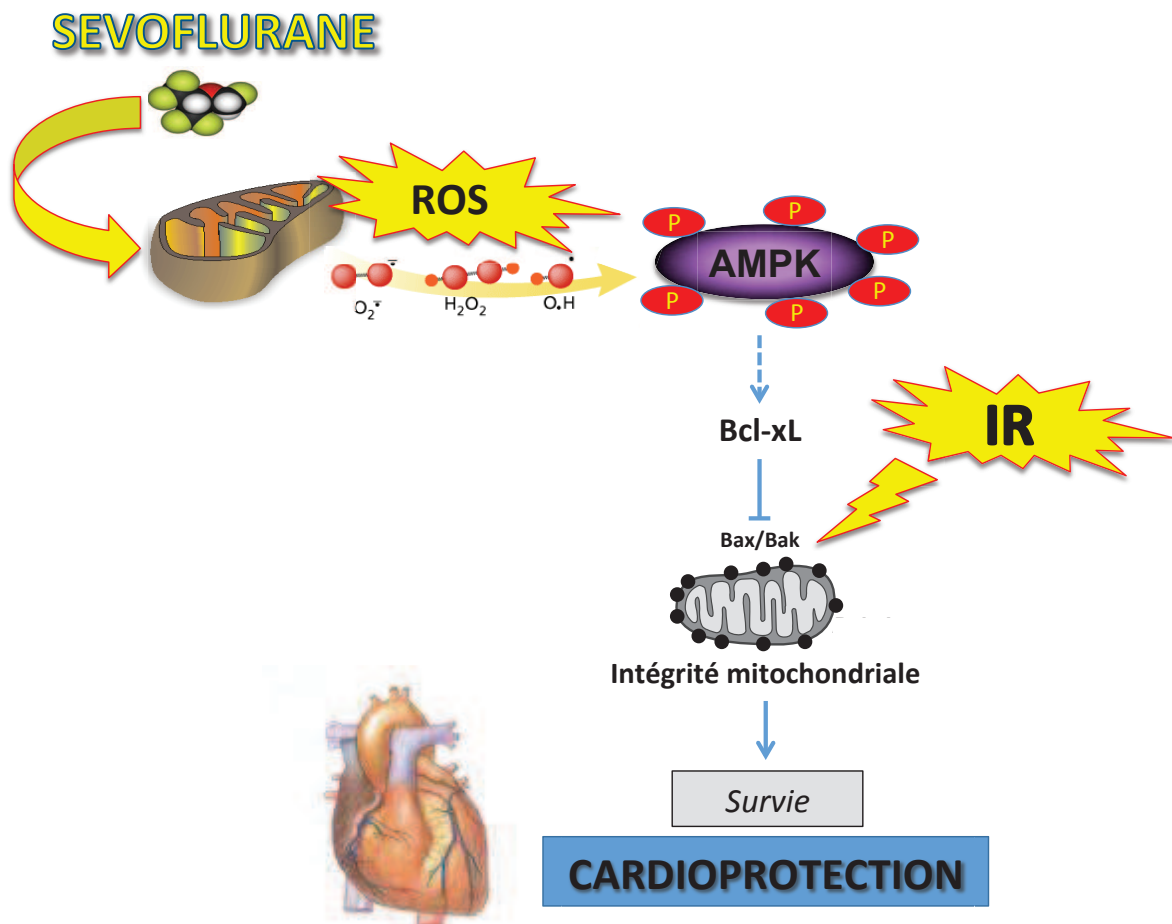


Figure 6 : CONCLUSION

## BIBLIOGRAPHIE

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. Lienhart A, Auroy Y, Péquignot F, Benhamou D, Warszawski J, Bovet M, Jouglu E: Survey of anesthesia-related mortality in France. *Anesthesiology* 2006; 105:1087–97
2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124–36
3. Bland JH, Lowenstein E: Halothane-induced decrease in experimental myocardial ischemia in the non-failing canine heart. *Anesthesiology* 1976; 45:287–93
4. Warltier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT: Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology* 1988; 69:552–65
5. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM: Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86:699–709
6. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87:361–70
7. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87:1182–90
8. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC: Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999; 91:1437–46
9. Hert SG De, Cromheecke S, Broecke PW ten, Mertens E, Blier IG De, Stockman BA, Rodrigus IE, Linden PJ Van der: Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* 2003; 99:314–23
10. Hert SG De, Broecke PW ten, Mertens E, Sommeren EW Van, Blier IG De, Stockman BA, Rodrigus IE: Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 2002; 97:42–9
11. Hert SG De, Linden PJ Van der, Cromheecke S, Meeus R, Broecke PW ten, Blier IG De, Stockman BA, Rodrigus IE: Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2004; 101:9–20

12. Hert SG De, Linden PJ Van der, Cromheecke S, Meeus R, Nelis A, Reeth V Van, Broecke PW ten, Blier IG De, Stockman BA, Rodrigus IE: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 2004; 101:299–310
13. Conzen PF, Fischer S, Detter C, Peter K: Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 2003; 99:826–33
14. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasché P: Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 100:II340–344
15. Julier K, Silva R da, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, Chassot P-G, Schmid ER, Turina MI, Segesser LK von, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003; 98:1315–27
16. Lucchinetti E, Hofer C, Bestmann L, Hersberger M, Feng J, Zhu M, Furrer L, Schaub MC, Tavakoli R, Genoni M, Zollinger A, Zaugg M: Gene regulatory control of myocardial energy metabolism predicts postoperative cardiac function in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery: inhalational versus intravenous anesthetics. *Anesthesiology* 2007; 106:444–57
17. Symons JA, Myles PS: Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br. J. Anaesth.* 2006; 97:127–36
18. Pagel PS: Myocardial protection by volatile anesthetics in patients undergoing cardiac surgery: a critical review of the laboratory and clinical evidence. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2013; 27:972–82
19. Kevin LG, Novalija E, Riess ML, Camara AKS, Rhodes SS, Stowe DF: Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts. *Anesth. Analg.* 2003; 96:949–955, table of contents
20. Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa JF Jr, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2002; 97:1485–90
21. Tanaka K, Weihrauch D, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Mitochondrial adenosine triphosphate-regulated potassium channel opening acts as a trigger for isoflurane-induced preconditioning by generating reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2003; 98:935–43



22. Bouwman RA, Musters RJP, Beek-Harmsen BJ van, Lange JJ de, Boer C: Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2004; 100:506–14
23. Hirata N, Shim YH, Pravdic D, Lohr NL, Pratt PF Jr, Weihrauch D, Kersten JR, Warltier DC, Bosnjak ZJ, Bienengraeber M: Isoflurane differentially modulates mitochondrial reactive oxygen species production via forward versus reverse electron transport flow: implications for preconditioning. *Anesthesiology* 2011; 115:531–40
24. Lu X, Liu H, Wang L, Schaefer S: Activation of NF-kappaB is a critical element in the antiapoptotic effect of anesthetic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009; 296:H1296–1304
25. Hanouz J-L, Zhu L, Lemoine S, Durand C, Lepage O, Massetti M, Khayat A, Plaud B, Gérard J-L: Reactive oxygen species mediate sevoflurane- and desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesth. Analg.* 2007; 105:1534–1539, table of contents
26. Towler MC, Hardie DG: AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* 2007; 100:328–41
27. Collard CD, Gelman S: Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94:1133–8
28. Avkiran M, Marber MS: Na(+)/H(+) exchange inhibitors for cardioprotective therapy: progress, problems and prospects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39:747–53
29. Liu H, Zhang HY, Zhu X, Shao Z, Yao Z: Preconditioning blocks cardiocyte apoptosis: role of K(ATP) channels and PKC-epsilon. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; 282:H1380–1386
30. Yellon DM, Hausenloy DJ: Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357:1121–35
31. Hausenloy DJ, Yellon DM: Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* 2013; 123:92–100
32. Zhao Z-Q, Vinten-Johansen J: Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55:438–55
33. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J: The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43:860–78
34. Vinten-Johansen J: Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61:481–97

35. Terada LS, Rubinstein JD, Lesnefsky EJ, Horwitz LD, Leff JA, Repine JE: Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.* 1991; 260:H805–810
36. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F: Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 2000; 5:415–8
37. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239–57
38. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, et al.: Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012; 19:107–20
39. Cotter TG: Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9:501–7
40. Johnson CE, Kornbluth S: Caspase cleavage is not for everyone. *Cell* 2008; 134:720–1
41. Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, Denecker G, Depuydt B, Valck D De, Wilde G De, Goossens V, Grooten J, Haegeman G, Heyninck K, Penning L, Plaisance S, Vancompernelle K, Crieckinge W Van, Vandenabeele P, Vanden Berghe W, Craen M Van de, Vandevoorde V, Vercammen D: TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. *J. Inflamm.* 1995; 47:67–75
42. Shen H-M, Codogno P: Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 2011; 7:457–65
43. Tait SWG, Green DR: Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 2008; 27:6452–61
44. Llambi F, Green DR: Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011; 21:12–20
45. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR: The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* 2010; 37:299–310
46. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, Delft MF van, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DCS: Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007; 315:856–9

47. Chen C, Edelstein LC, Gélinas C: The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20:2687–95
48. Chen N, Chen X, Huang R, Zeng H, Gong J, Meng W, Lu Y, Zhao F, Wang L, Zhou Q: BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:10004–12
49. Tang TT-L, Dowbenko D, Jackson A, Toney L, Lewin DA, Dent AL, Lasky LA: The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:14255–65
50. Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group: Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346:549–56
51. Heyland D, Muscedere J, Wischmeyer PE, Cook D, Jones G, Albert M, Elke G, Berger MM, Day AG, Canadian Critical Care Trials Group: A randomized trial of glutamine and antioxidants in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368:1489–97
52. Burns KEA, Chu MWA, Novick RJ, Fox SA, Gallo K, Martin CM, Stitt LW, Heidenheim AP, Myers ML, Moist L: Perioperative N-acetylcysteine to prevent renal dysfunction in high-risk patients undergoing cabg surgery: a randomized controlled trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2005; 294:342–50
53. Frässdorf J, Hert S De, Schlack W: Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Br. J. Anaesth.* 2009; 103:89–98
54. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC: Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br. J. Anaesth.* 2003; 91:551–65
55. Uecker M, Silva R Da, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M: Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2003; 99:138–47
56. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate- dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 2000; 92:1731–9
57. Zhong C, Zhou Y, Liu H: Nuclear factor kappaB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology* 2004; 100:540–6
58. Raphael J, Zuo Z, Abedat S, Beeri R, Gozal Y: Isoflurane preconditioning decreases myocardial infarction in rabbits via up-regulation of hypoxia inducible factor 1 that is mediated by mammalian target of rapamycin. *Anesthesiology* 2008; 108:415–25

59. Raphael J, Rivo J, Gozal Y: Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br. J. Anaesth.* 2005; 95:756–63
60. Silva R da, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M: Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2004; 100:59–69
61. Hanouz J-L, Yvon A, Massetti M, Lepage O, Babatasi G, Khayat A, Bricard H, Gérard J-L: Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 2002; 97:33–41
62. Hardie DG: The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 2004; 117:5479–87
63. Mahlapuu M, Johansson C, Lindgren K, Hjälml G, Barnes BR, Krook A, Zierath JR, Andersson L, Marklund S: Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004; 286:E194–200
64. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LGD, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D: LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol. CB* 2003; 13:2004–8
65. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG: Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2005; 2:9–19
66. Momcilovic M, Hong S-P, Carlson M: Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:25336–43
67. Chen Z, Shen X, Shen F, Zhong W, Wu H, Liu S, Lai J: TAK1 activates AMPK-dependent cell death pathway in hydrogen peroxide-treated cardiomyocytes, inhibited by heat shock protein-70. *Mol. Cell. Biochem.* 2013; 377:35–44
68. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B: Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 2005; 54:1331–9
69. Russell RR 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH: Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:H643–649
70. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Berghe G Van den, Carling D, Hue L: Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol. CB* 2000; 10:1247–55

71. Ma XM, Blenis J: Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10:307–18
72. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS: AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:23977–80
73. Meijer AJ, Codogno P: AMP-activated protein kinase and autophagy. *Autophagy* 2007; 3:238–40
74. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Legrand A, Beaudoux J-L: Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* 2005; 54:829–34
75. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G: Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ. Res.* 1991; 69:1476–86
76. Zitta K, Meybohm P, Bein B, Ohnesorge H, Steinfath M, Scholz J, Albrecht M: Cytoprotective effects of the volatile anesthetic sevoflurane are highly dependent on timing and duration of sevoflurane conditioning: findings from a human, in-vitro hypoxia model. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 645:39–46
77. Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr: HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95:2979–84
78. Park M, Youn B, Zheng X, Wu D, Xu A, Sweeney G: Globular adiponectin, acting via AdipoR1/APPL1, protects H9c2 cells from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis. *PLoS One* 2011; 6:e19143
79. Cuadrado I, Fernández-Velasco M, Boscá L, Las Heras B de: Labdane diterpenes protect against anoxia/reperfusion injury in cardiomyocytes: involvement of AKT activation. *Cell Death Dis.* 2011; 2:e229
80. Yogalingam G, Hwang S, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *J. Biol. Chem.* 2013; 288:18947–60
81. Franks NP, Lieb WR: Temperature dependence of the potency of volatile general anesthetics: implications for in vitro experiments. *Anesthesiology* 1996; 84:716–20
82. Strum DP, Eger EI 2nd: Partition coefficients for sevoflurane in human blood, saline, and olive oil. *Anesth. Analg.* 1987; 66:654–6

83. Haseneder R, Kratzer S, Meyer L von, Eder M, Kochs E, Rammes G: Isoflurane and sevoflurane dose-dependently impair hippocampal long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol.* 2009; 623:47–51
84. Nishikawa K, Kubo K, Ishizeki J, Takazawa T, Saito S, Goto F: The interaction of noradrenaline with sevoflurane on GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2005; 1039:153–61
85. Katoh T, Ikeda K: The minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in humans. *Anesthesiology* 1987; 66:301–3
86. Lin T-C, Lu C-C, Li C-Y, Chang C-C, Ho S-T: Arterial blood concentration of sevoflurane during single-breath induction and tracheal intubation in gynecologic patients. *J. Clin. Anesth.* 2008; 20:496–500
87. Lamberts RR, Onderwater G, Hamdani N, Vreden MJA, Steenhuisen J, Eringa EC, Loer SA, Stienen GJM, Bouwman RA: Reactive oxygen species-induced stimulation of 5'AMP-activated protein kinase mediates sevoflurane-induced cardioprotection. *Circulation* 2009; 120:S10–15
88. Lotz C, Fisslthaler B, Redel A, Smul TM, Stumpner J, Pocij J, Roewer N, Fleming I, Kehl F, Lange M: Activation of adenosine-monophosphate-activated protein kinase abolishes desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction in vivo. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2011; 25:66–71
89. Zhao J, Wang F, Zhang Y, Jiao L, Lau WB, Wang L, Liu B, Gao E, Koch WJ, Ma X-L, Wang Y: Sevoflurane Preconditioning Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Caveolin-3-Dependent Cyclooxygenase-2 Inhibition. *Circulation* 2013; 128:S121–129
90. Raphael J, Abedat S, Rivo J, Meir K, Beerli R, Pugatsch T, Zuo Z, Gozal Y: Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 318:186–94

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

*Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.*

*Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.*

*Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.*

*J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.*

*Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.*

*Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.*

*Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.*

## RESUME

L'ischémie-reperfusion (IR) myocardique est un mécanisme lésionnel responsable de la première cause de morbi-mortalité péri-opératoire. L'effet protecteur vis-à-vis de l'IR par le préconditionnement anesthésique (APC) par les agents anesthésiques volatiles, en particulier par le sévoflurane, a été largement démontré chez l'animal et chez l'homme. A l'heure actuelle, les mécanismes d'action de l'APC restent incomplètement compris, en dehors d'un rôle majeur des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nous avons émis l'hypothèse que la voie de signalisation de l'AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) serait impliquée dans l'APC par le sévoflurane vis-à-vis de l'IR.

Nous avons mis au point un modèle *in vitro* d'étude de l'IR et de l'APC dans des cultures de cardiomyoblastes de rat (cellules H9c2). Notre modèle reproduit l'effet protecteur de l'APC avec une diminution de la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol, du clivage de la procaspase 3 et de l'activité de la caspase 3 active en situation d'IR. Nous avons montré que le sévoflurane induit une phosphorylation rapide et transitoire de l'AMPK qui est efficace avec une phosphorylation de ses cibles protéiques (ACC et p70S6K). Nous avons montré également que cette activation de la voie de l'AMPK était dépendante des ROS produits par le sévoflurane. De plus, nous avons identifié la protéine anti-apoptotique Bcl-xL comme un potentiel effecteur de l'effet anti-apoptotique de l'APC par le sévoflurane vis-à-vis de l'IR.

Notre étude montre pour la première fois une activation directe de la voie de l'AMPK par le sévoflurane de manière ROS-dépendante. Ceci ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le management péri-opératoire, notamment en chirurgie cardiaque.

