

Université de Montréal

**Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur
l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 :
implications du citrate**

Par
Geneviève Vincent

Département de Biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Biochimie

avril 2003

©, Geneviève Vincent, 2003



W

4

U58

2003

v. 136

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
**Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur
l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 :
implications du citrate**

présentée par :
Geneviève Vincent

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Philippe Crine* : président-rapporteur

Dr Christine Des Rosiers[£] : directeur de recherche

Dr Marc Prentki[£] : membre du jury

Dr John C. Chatham[∇] : examinateur externe

Dr Gaetan Thibault[§] : représentant du doyen de la FÉS

* Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

£ Département de nutrition, Faculté de médecine, Université de Montréal

∇ Departments of physiology and biophysics, University of Alabama

§ Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Résumé | ii |
| Résumé (version anglaise) | iii |
| Table des matières | iv |
| Liste des tableaux | vi |
| Liste des figures | viii |
| Liste des abréviations | xi |
| Remerciements | xiii |
| Dédicace | xiv |
| L'avant-propos | xv |

RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires demeurent une des principales causes de mortalité, bien que les recherches des dernières décennies aient permis d'améliorer considérablement les techniques d'interventions chirurgicales et pharmacologiques. Parmi les nombreux facteurs impliqués dans la dysfonction du cœur et la progression de la maladie, on retrouve les perturbations du métabolisme énergétique. À cet égard, cette étude vise à caractériser le processus de cataplérose du citrate, un phénomène défini comme étant le transfert du citrate de la mitochondrie au cytosol, et documenter sa régulation dans le cœur intact sain et malade. L'intérêt pour le citrate, un métabolite mitochondrial crucial à la production d'énergie par le cycle de Krebs, a été suscité par des études démontrant que le myocarde de patients atteints de maladies coronariennes libère une quantité de citrate proportionnelle à la sévérité de la maladie. En outre, il est également proposé que le citrate cytosolique joue un rôle clé dans la sélection des substrats énergétiques utilisés par le cœur.

L'approche expérimentale utilisée est le cœur de rat perfusé *ex vivo* en présence de substrats énergétiques marqués au carbone 13 et l'analyse des isotopomères de masse par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse. Les mesures d'efflux de citrate ont été corrélées avec des paramètres fonctionnels et métaboliques telle que la contribution relative des substrats énergétiques à la synthèse du citrate. Les résultats de cette thèse démontrent que la libération de citrate par le cœur perfusé *ex vivo* -de l'ordre de 5 à 21 nmol.g⁻¹.min⁻¹ et représentant < 2% du flux du cycle de Krebs- reflète le transfert du citrate de la mitochondrie au cytosol. Ce processus (i) est spécifique, (ii) n'est pas corrélé avec un indice de nécrose, (iii) peut être modulé par la demande énergétique et l'apport en substrats exogènes pour la synthèse de citrate, (iv) est augmenté chez les cœurs hypertrophiques, (v) semble atteindre un niveau maximal en condition physiologique, possiblement limité par la faible activité du transporteur mitochondrial et/ou plasmatique. Les résultats de cette thèse renforcent l'importance de clarifier le rôle du citrate cytosolique comme molécule signal, spécifiquement comme précurseur du malonyl-CoA, un régulateur de l'oxydation des acides gras d'un grand intérêt clinique.

Mots clés : métabolisme énergétique, cycle de Krebs, perfusion *ex vivo* de cœur de rat, chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, hypertension et hypertrophie

SUMMARY

Cardiovascular diseases remain one of the principal causes of hospitalization, morbidity and mortality, although researches over the past decades have considerably improved the surgical techniques and the pharmacological interventions. Alterations in energy metabolism have been found to be implicated in heart dysfunction and disease progression. Thus, the aim of the present study was to characterize the process of citrate cataplerosis, a phenomenon defined as the citrate efflux from the mitochondria to the cytosol, and to document its regulation in the intact heart. This interest for citrate, a mitochondrial metabolite of crucial importance for energy production by the citric acid cycle, arose from studies demonstrating that patients suffering from coronary heart diseases release amounts of citrate proportionally correlated with the severity of the disease. In addition, cytosolic citrate is proposed to have a key role in substrate fuel selection by the heart.

The experimental approach is the *ex vivo* perfused rat heart using ^{13}C -labelled substrates combined with mass isotopomer analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Measurements of citrate efflux in effluent perfusate were correlated with indices of cardiac performance and metabolic status of the heart such as the relative contribution of substrates for citrate synthesis. Altogether, results from the present thesis demonstrate that citrate release from *ex vivo* perfused rat hearts, which ranges from 5 to 21 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ representing < 2% of the citric acid cycle flux, reflects citrate transfer from the mitochondria to the cytosol. This process (i) is specific, (ii) is not correlated with indices of cellular necrosis, (iii) can be modulated by energy demand and exogenous substrate supply for citrate synthesis, (iv) is increased in hypertrophied hearts, and (v) seems to reach a maximal level in the presence of a physiological substrate mixture, probably due to the low activity of the mitochondrial and/or plasma membrane transporter. Hence, results from this thesis reinforce the importance of clarifying the role of cytosolic citrate as a signal molecule, specifically as the precursor of malonyl-CoA, the fatty acid oxidation inhibitor having a major clinical interest.

Key words: energy metabolism, citric acid cycle, *ex vivo* rat heart perfusion, gas chromatography-mass spectrometry, hypertension and hypertrophy.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|----------|
| CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE..... | 1 |
| I.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE | 2 |
| I.2 LES MALADIES DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE | 3 |
| I.2.1 Généralités | 3 |
| I.2.2 L'ischémie et l'infarctus du myocarde | 3 |
| I.2.3 L'hypertension | 6 |
| I.2.4 L'hypertrophie du myocarde..... | 8 |
| I.3 LES FONDEMENTS DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE | 11 |
| I.3.1 Généralités | 11 |
| I.3.2 Les substrats énergétiques du cœur..... | 12 |
| I.3.2.1 Les substrats exogènes | 13 |
| I.3.2.2 Les substrats endogènes..... | 14 |
| I.4 LE MÉTABOLISME CARDIAQUE ET SA RÉGULATION..... | 15 |
| I.4.1 Généralités | 15 |
| I.4.2 Le métabolisme des glucides et sa régulation..... | 16 |
| I.4.2.1 Le transport du glucose..... | 16 |
| I.4.2.2 La glycolyse et sa régulation | 17 |
| I.4.2.3 L'oxydation du lactate et du pyruvate..... | 20 |
| I.4.3 Le métabolisme des lipides et sa régulation..... | 24 |
| I.4.3.1 Le transport des lipides | 24 |
| I.4.3.2 La β -oxydation des acides gras et sa régulation..... | 27 |
| I.4.4 Le métabolisme des corps cétoniques | 28 |
| I.4.5 Le CAC : un carrefour métabolique..... | 28 |
| I.4.5.1 Les réactions du CAC..... | 28 |
| I.4.5.2 L'anaplérose..... | 30 |
| I.4.5.3 Les navettes et les transporteurs | 31 |
| I.4.6 L'ATP, sa formation et sa régulation | 32 |
| I.5 LA RÉGULATION RÉCIPROQUE ET CONCERTÉE DE L'UTILISATION DES GLUCIDES ET DES LIPIDES..... | 35 |
| I.5.1 Le cycle de Randle | 35 |
| I.5.2 Le citrate : bien plus qu'un intermédiaire du cycle de Krebs..... | 37 |
| I.5.3 Le malonyl-CoA | 40 |
| I.5.3.1 Les composantes du métabolisme du malonyl-CoA..... | 41 |
| I.5.3.2 Les précurseurs de l'acétyl-CoA cytosolique..... | 44 |
| I.5.3.3 Le malonyl-CoA, un inhibiteur de la CPT-I..... | 47 |
| I.6 LORSQUE MÉTABOLIQUE ET GÉNOMIQUE SE RENCONTRENT..... | 48 |
| I.7 LE MÉTABOLISME DES SUBSTRATS DANS LA PATHOLOGIE | 52 |
| I.7.1 Les conséquences métaboliques de la privation d'oxygène : des changements aigus..... | 52 |
| I.7.2 Les conséquences métaboliques de l'hypertrophie myocardique : des changements chroniques | 54 |
| I.7.3 Le citrate et le malonyl-CoA : les implications cliniques | 58 |

| | |
|--|--------------|
| I.8 LES AGENTS PHARMACOLOGIQUES ET LE MÉTABOLISME CARDIAQUE . | 59 |
| I.9 LES APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES POUR L'INVESTIGATION DU MÉTABOLISME CARDIAQUE..... | 63 |
| <i>I.9.1 La perfusion du cœur isolée de rat.....</i> | 63 |
| I.9.1.1 Le modèle Langendorff | 63 |
| I.9.1.2 Le modèle du « cœur au travail » | 64 |
| <i>I.9.2 L'utilisation des traceurs isotopiques pour l'investigation du métabolisme cardiaque</i> | 67 |
| I.9.2.1 Les isotopes stables : définition et nomenclature | 68 |
| <i>I.9.3 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) : les aspects techniques</i> | 70 |
| I.9.3.1 Dérivation chimique des métabolites d'intérêt | 70 |
| I.9.3.2 La chromatographie en phase gazeuse | 71 |
| I.9.3.3 La spectrométrie de masse | 71 |
| <i>I.9.4 L'analyse du profil des isotopomères de masse</i> | 75 |
| CHAPITRE II : OBJECTIFS DES TRAVAUX ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.... | 78 |
| CHAPITRE III : MANUSCRIT I..... | 81 |
| CHAPITRE IV : MANUSCRIT II..... | 116 |
| CHAPITRE V : MANUSCRIT III..... | 146 |
| CHAPITRE VI : DISCUSSION..... | 177 |
| VI.1 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES..... | 178 |
| <i>VI.1.1 Le choix du modèle d'étude.....</i> | 178 |
| VI.1.1.1 Le choix des substrats exogènes et de la stratégie de marquage..... | 181 |
| <i>VI.1.2 Le choix du modèle animal de pathologie cardiaque</i> | 184 |
| VI.2 CONSIDÉRATIONS PHYSIOLOGIQUES | 186 |
| <i>VI.2.1 La cataplérose du citrate et sa régulation</i> | 186 |
| VI.2.1.1 La spécificité du processus de libération du citrate..... | 187 |
| VI.2.1.2 La cataplérose du citrate est modulée par la disponibilité des substrats exogènes et la demande énergétique | 189 |
| <i>VI.2.2 La cataplérose du citrate en conditions physiologiques</i> | 190 |
| VI.2.2.1 Effet d'une augmentation de la concentration en acides gras | 192 |
| <i>VI.2.3 La cataplérose du citrate en conditions pathologiques : effet de l'hypertrophie</i> | 195 |
| <i>VI.2.4 Le citrate : une molécule signal?</i> | 197 |
| <i>VI.2.5 Autres rôles potentiels de la cataplérose du citrate mitochondriale.....</i> | 198 |
| CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES..... | 201 |
| CHAPITRE VIII : BIBLIOGRAPHIE..... | 204 |
| ANNEXE 1..... | xviii |
| ANNEXE 2..... | lii |

LISTES DES TABLEAUX

Cette thèse étant présentée sous forme de « thèse par articles », les tableaux et les figures sont répertoriés selon leur ordre d'apparition, avec un numéro et une page correspondante, afin d'éviter toute ambiguïté.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

| | | |
|---------------|---|----|
| Tableau I. | Changements transcriptionnels induits par l'hypertrophie cardiaque .. | 10 |
| Tableau II. | Principaux sites de régulation de la glycolyse | 18 |
| Tableau III. | Conditions physiologiques et pathologiques ayant une influence sur la captation du glucose, le contenu cellulaire en glycogène et l'activité de la PFK-1..... | 20 |
| Tableau IV. | Conditions physiologiques et pathologiques ayant une influence sur l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) | 22 |
| Tableau V. | Réactions métaboliques impliquées dans la production d'énergie..... | 33 |
| Tableau VI. | Quantité d'ATP produite à partir d'une mole des principaux substrats exogènes utilisés par le cœur normoxique | 34 |
| Tableau VII. | Production d'énergie par les réactions de phosphorylation au niveau des substrats | 35 |
| Tableau VIII. | Effet du citrate sur diverses enzymes du métabolisme cardiaque ainsi que sur d'autres tissus | 40 |
| Tableau IX. | Principaux intervenants reliés au métabolisme du malonyl-CoA et à sa régulation | 43 |
| Tableau X. | Abondance relative des principaux éléments présents dans les composés organiques | 69 |

CHAPITRE II : OBJECTIFS DES TRAVAUX ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

CHAPITRE III : MANUSCRIT I

«Citrate release by perfused rat hearts : a window on mitochondrial cataplerosis»

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tableau I. | ¹³ C-Llabeling of metabolites resulting from [1- ¹³ C]oleate, [U- ¹³ C ₃]lactate, and [U- ¹³ C ₃]pyruvate..... | 101 |
| Tableau II. | Flux parameters determined in hearts perfused with [1- ¹³ C]oleate, [U- ¹³ C ₃]lactate, and [U- ¹³ C ₃]pyruvate..... | 102 |

CHAPITRE IV : MANUSCRIT II

«Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ^{13}C -substrates and *ex vivo* perfusion in the working mode»

| | | |
|--------------|--|-----|
| Tableau I. | Functional and physiological parameters of perfused working WKY and SHR hearts..... | 130 |
| Tableau II. | ^{13}C -Labeling of CAC intermediates isolated from working WKY and SHR hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$ and $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{oleate}$ | 133 |
| Tableau III. | ^{13}C -Enrichment and flux values determined in perfused working WKY and SHR hearts..... | 134 |

CHAPITRE V : MANUSCRIT III

«Citrate synthesis and release by perfused working rat hearts and their modulation by fatty acids»

| | | |
|--------------|--|-----|
| Tableau I. | Effects of fatty acids on the functional and physiological parameters of perfused working rat hearts..... | 159 |
| Tableau II. | ^{13}C -Labeling of CAC intermediates isolated from working Wistar rat hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, and $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{fatty acid}$ | 160 |
| Tableau III. | ^{13}C -Enrichments of pyruvate and of the acetyl and OAA moieties of citrate isolated from working rat hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, and $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{fatty acid}$ | 161 |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

| | |
|---|----|
| Figure 1. Principales voies métaboliques impliquées dans la conversion des substrats énergétiques en énergie dans le cœur | 12 |
| Figure 2. Aperçu général des principales étapes de la glycolyse et des régulateurs de la phosphofructokinase-1 (PFK-1)..... | 19 |
| Figure 3. Représentation schématique du concept de compartimentation du métabolisme du lactate | 21 |
| Figure 4. Régulation du complexe multienzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH) | 23 |
| Figure 5. Représentation schématique du système de transport mitochondrial des acyl-CoA à chaîne longue..... | 26 |
| Figure 6. Aperçu général des réactions de Krebs..... | 29 |
| Figure 7. Réactions anapérotiques dans le muscle cardiaque et squelettique..... | 31 |
| Figure 8. Représentation schématique de l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose et le lactate..... | 37 |
| Figure 9. Représentation schématique de mécanismes possiblement responsables du transfert des unités acétyls mitochondriales jusqu'au site cytosolique de synthèse du malonyl-CoA dans le muscle cardiaque..... | 45 |
| Figure 10. Le citrate cytosolique : molécule centrale dans la régulation du glucose et des acides gras dans le muscle squelettique..... | 46 |
| Figure 11. La génétique de l'énergétique | 49 |
| Figure 12. Cibles du PPAR α au niveau de l'importation, de la thioestérification et la β -oxydation des acides gras..... | 51 |
| Figure 13. Photographie illustrant les trois canules insérées dans le muscle cardiaque : la canule aortique, la canule de la veine pulmonaire et la canule intra-ventriculaire | 65 |
| Figure 14. Représentation schématique du montage de perfusion du « cœur au travail » en mode semi-recirculant..... | 67 |
| Figure 15. Représentation schématique du spectre de masse d'une molécule analysée par CGSM en mode d'impact électronique | 73 |
| Figure 16. Représentation schématique d'un spectromètre de masse couplé à une chromatographie en phase gazeuse..... | 75 |

CHAPITRE II : OBJECTIFS DES TRAVAUX ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

CHAPITRE III: MANUSCRIT I

«Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis»

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Experimental design | 90 |
| Figure 2. Correlation between the mass isotopomer distribution of tissue and effluent citrate labeled from various ¹³ C precursors of acetyl-CoA and oxaloacetate (OAA)..... | 95 |
| Figure 3. Metabolic status of hearts perfused in the presence of the medium-chain fatty acid (MCFA) octanoate..... | 98 |
| Figure 4. Citrate release rates by hearts perfused with physiological substrate mixtures | 100 |
| Figure 5. Effect of 10 mM 1,2,3-benzenetricarboxylic acid (BTC; hatched bars) and 1,2,4-BTC (filled bars) on citrate release rates | 103 |
| Figure 6. Schematic overview of metabolic processes and factors relevant to mitochondrial citrate cataplerosis in the heart..... | 105 |

CHAPITRE IV : MANUSCRIT II

«Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode»

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Schematic overview of the semi-recirculating working heart set up..... | 125 |
| Figure 2. Citrate release rates (A) and CAC intermediate tissue concentrations (B) in WKY (filled bars) and SHR (hatched bars) hearts..... | 131 |
| Figure 3. Total perfusate lactate and pyruvate concentrations (A) and lactate and pyruvate uptake and efflux rates (B) in WKY (filled bars) and SHR (hatched bars) hearts | 136 |

CHAPITRE V : MANUSCRIT III

«Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts»

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Effects of fatty acids on flux parameters relevant to citrate synthesis.... | 162 |
| Figure 2. Effects of fatty acids on lactate and pyruvate uptake and efflux rates.... | 164 |

Figure 3. Effects of fatty acids on citric acid cycle (CAC) intermediate tissue concentrations (A), and total CAC intermediate tissue concentrations (B).....165

Figure 4. Effect of fatty acids on citrate release rates.....165

CHAPITRE VI : DISCUSSION

Figure 1. Représentation schématique de quelques exemples d'isotopomères du citrate obtenus suite au métabolisme des traceurs [1-¹³C]oléate, [U-¹³C₃]lactate et [U-¹³C₃]pyruvate.....183

Figure 2. Représentation schématique de la provenance du [¹²C]lactate mesuré dans l'effluent coronarien des cœurs perfusés.....184

Figure 3. Phénotypage métabolique des cœurs perfusés *ex vivo* et *in situ* : comparaison de la dynamique cardiaque en lien avec la cataplérose du citrate dans divers modèles d'études.....192

Figure 4. Phénotypage métabolique du cœur perfusé *ex vivo* selon le modèle du « cœur au travail » : effets des acides gras.....194

Figure 5. Contribution relative (%) des substrats énergétiques à la production d'ATP dans le cœur sain perfusé « au travail » en présence de diverses concentrations d'acides gras.....194

Figure 6. Phénotypage métabolique du cœur perfusé *ex vivo* selon le modèle du « cœur au travail » : effets de l'hypertrophie cardiaque196

LISTE DES ABRÉVIATIONS

^{13}C : Carbone 13

AcAc : Acétoacétate

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ACL : ATP-citrate lyase

ADP : Adénosine diphosphate

AGCL : Acide gras à chaîne longue

AMP : Adénosine monophosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : Adénosine monophosphate Kinase

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BTC : 1,2,3- ou 1,2,4-Benzénetricarboxylique acide

CAC : Cycle de l'acide citrique

CGSM : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CoA : Coenzyme A

CPT-I : Carnitine palmitoyl transférase-I

CPT-II : Carnitine palmitoyl transférase-II

FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide réduite

F1,6BP : Fructose-1,6-biphosphate

F2,6BP : Fructose-2,6-biphosphate

F6P : Fructose-6-phosphate

G6P : Glucose-6-phosphate

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

GIK : Glucose-insuline-potassium

GLUT : Transporteur de glucose

β -HB : β -hydroxybutyrate

HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche

ICDH : Isocitrate déshydrogénase

K_m : Constante de Michaelis-Menton

LDH : Lactate déshydrogénase

m/z : Rapport masse/charge

MCAD : Acyl-CoA déshydrogénase des chaînes moyennes

MCD : Malonyl-CoA décarboxylase

MPE : Pourcentage d'enrichissement molaire

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

OAA : Oxaloacétate

PC : Pyruvate carboxylase

PDH : Pyruvate déshydrogénase

PDK : Pyruvate déshydrogénase kinase

PFK : Phosphofructokinase

PPAR : « Peroxisome proliferator-activated receptor α »

SHR: « Spontaneously hypertensive rat »

TGF- β : « Transforming growth factor- β »

TMZ : Trimétazidine

WKY: Wistar Kyoto.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement mon directeur de recherche, Dr Christine Des Rosiers, pour son enseignement très dynamique, sa grande disponibilité et son aide constante tout au long de la réalisation de ce projet d'étude. De par sa rigueur scientifique, son intérêt et son optimisme, elle m'a permis de progresser et d'acquérir les qualités nécessaires à la réalisation des recherches présentées dans cette thèse. J'aimerais également lui exprimer ma gratitude pour toutes les opportunités qu'elle m'a offerte d'assister et de présenter à plusieurs congrès internationaux. Mes sincères remerciements à toi, Christine.

J'aimerais exprimer ma gratitude envers tous mes collègues de laboratoire qui ont su au cours des années m'apporter leur aide et leurs encouragements. Avec une pensée plus particulière pour Dr Blandine Comte, Bertrand Bouchard, Myriame Poirier et Maya Khairallah, pour leur aide, leur grande disponibilité et leurs conseils, autant scientifiques que personnels, mais surtout pour leur amitié.

Je tiens également à remercier de tout cœur mes parents, Carole et Marcel, ainsi que mon frère, Charles, pour leur soutien et leurs encouragements si précieux qui m'ont permis de mener à terme ce projet de doctorat.

Je remercie chaleureusement mon conjoint, Erick, pour son soutien moral, son intérêt, ses encouragements et ses conseils judicieux tout au long de mon cheminement d'études graduées.

Je remercie tous les membres du jury pour le temps qu'ils m'ont accordé à lire et commenter ma thèse de doctorat.

Je remercie également les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) pour leur aide financière tout au long de mes études graduées.

*Pour ceux que j'aime !
mes parents, Carole et Marcel,
mon frère, Charles,
mon amour, Erick
et mon trésor, Elizabeth*

L'AVANT-PROPOS

Malgré de considérables avancées dans les divers domaines de recherches en cardiovasculaire, les taux de morbidité et de mortalité demeurent considérablement élevés chez les patients souffrants de maladies cardiovasculaires. Une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la diminution de la performance cardiaque observée chez les patients souffrant de ces maladies est essentielle au développement et à l'optimisation de thérapies protectrices ou salvatrices. Les perturbations du métabolisme énergétique se retrouvent parmi les nombreux facteurs impliqués dans la dysfonction du muscle cardiaque. À cet égard, l'objectif des recherches présentées dans cette thèse a été de caractériser le processus de cataplérose du citrate et sa régulation dans le cœur sain et malade. Spécifiquement, la cataplérose du citrate est documentée en relation avec le métabolisme des substrats énergétiques permettant la synthèse du citrate. Comme la cataplérose du citrate représente une fuite de carbones catalytiques hors du cycle de Krebs, une attention particulière a été portée à la contribution du pyruvate à la synthèse du citrate par carboxylation, une voie anaplérotique qui catalyse l'entrée de carbones catalytiques dans le cycle. De fait, il est proposé que l'entrée et la sortie de carbones catalytiques dans le cycle de Krebs puisse réguler la concentration tissulaire des intermédiaires du cycle.

Situé dans la matrice mitochondriale, le cycle de Krebs¹ est un processus crucial à la production d'énergie par le muscle cardiaque. Le cycle est composé de huit intermédiaires, le premier étant le citrate. Outre son rôle de premier intermédiaire du cycle de Krebs dans la mitochondrie, il est proposé que le citrate puisse jouer un rôle clé dans la sélection des substrats énergétiques utilisés par le cœur. Plus précisément, il pourrait agir au niveau du cytosol en tant que signal moléculaire modulant la sélection des substrats utilisés par le cœur pour produire son énergie. Dans les années 60, il a été démontré *in vitro* que le citrate cytosolique pouvait jouer un rôle d'inhibiteur de la glycolyse au niveau de la phosphofructokinase (PFK). Plus récemment, le citrate a reçu une attention particulière pour son implication dans l'inhibition de l'oxydation des acides gras. Il serait potentiellement le précurseur du

¹ Il est à noter que l'appellation cycle de l'acide citrique (CAC) sera également utilisée pour définir le cycle de Krebs.

malonyl-CoA, un inhibiteur de l'oxydation des acides gras qui agit au niveau de la carnitine palmitoyltransférase-I (CPT-I).

Les recherches présentées dans cette thèse de doctorat font suite aux questionnements soulevés par les travaux de Comte et ses collaborateurs (*Comte, Vincent, Des Rosiers et al., 1997a et b* - voir Annexe 1). Ces travaux avaient permis de mettre en évidence que le cœur perfusé *ex vivo* libère du citrate dans l'effluent coronarien. Afin de clarifier et de mieux documenter cette observation, la présente étude a débuté dans l'optique de répondre aux interrogations suivantes : Étant donné la faible activité du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques, est-ce que la libération de citrate par le cœur perfusé est un processus régulé ou le résultat de nécrose cellulaire? Est-ce que le taux de libération du citrate peut être modulé? Quel est l'impact de la maladie sur la cataplérose du citrate ?

L'étude du métabolisme cardiaque rapportée dans la présente thèse se démarque de par la combinaison des outils d'investigation utilisés. De façon globale, les fondements de cette recherche reposent sur l'utilisation de divers mélanges de substrats marqués au carbone 13, suivi de l'analyse des isotopomères de masse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM). À cette technique de pointe s'ajoutent des perfusions de cœurs isolés de rats, selon le modèle décrit par O. Langendorff et le modèle plus physiologique décrit par J.R. Neely et H.E. Morgan, soit le « cœur au travail ». En outre, afin de mettre en relation le métabolisme et la pathologie, un volet des recherches effectuées a été réalisé dans un modèle animal de pathologie humaine, c'est-à-dire le rat spontanément hypertendu (SHR) atteint d'hypertension et d'hypertrophie cardiaque.

La problématique de la première partie de cette étude a été abordée via l'utilisation de cœurs de rats perfusés *ex vivo* selon la méthode de Langendorff. Il était pertinent de (i) mettre en évidence que la libération de citrate, de la mitochondrie au cytosol, est un processus régulé et non pas le résultat de nécrose cellulaire ou d'une carence en oxygène, (ii) mieux caractériser le processus métabolique de libération de citrate par le cœur perfusé et de déterminer dans diverses conditions nutritionnelles si le citrate libéré dans l'effluent coronarien reflète bien la cataplérose du citrate mitochondrial, (iii) déterminer si cette sortie de citrate peut être bloquée par la présence d'un inhibiteur

du transporteur mitochondrial. Les résultats obtenus dans cette première étude sont publiés dans le journal « *American Journal of Physiology* » dans un article ayant pour titre : « *Citrate release by perfused rat hearts: A window on mitochondrial cataplerosis* » lequel est présenté au Chapitre III de cette thèse.

Par ailleurs, il est intéressant de mentionner que suite aux résultats obtenus dans ce premier volet du projet de recherche, une étude a été réalisée par Poirier et ses collaborateurs dont le but était de mettre en relation la libération de citrate par le cœur perfusé et la source d'unités acétyl-CoA utilisées pour la synthèse du malonyl-CoA, une molécule clé dans la régulation de l'oxydation des acides gras dans le cœur (Poirier, Vincent, Des Rosiers et al., 2002). Cette étude, retrouvée en Annexe 1, a pour titre : « *Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts* ».

Suite aux conclusions du manuscrit, la deuxième partie des recherches de cette thèse a été précédée par la mise au point du système de perfusion de « cœur au travail ». Il s'avérait pertinent de poursuivre la caractérisation du processus de cataplérose du citrate dans un modèle plus physiologique de perfusion d'organe et de déterminer l'impact de la maladie et de l'état nutritionnel. Un volet de ces recherches est publié dans le journal « *Molecular and Cellular Biochemistry* » dans un article ayant pour titre : « *Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode* », cet article est présenté au Chapitre IV de cette thèse. Le second volet est en attente de publication dans le journal « *American Journal of Physiology* » dans un article ayant pour titre : « *Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused working rat hearts* ». Le manuscrit est présenté au Chapitre V.

De façon générale, bien que les trois volets de cette recherche se soient déroulés en présence de divers mélanges de substrats énergétiques, et à l'aide de différents systèmes de perfusion, chacune des études comporte une analyse (i) de l'état fonctionnel et physiologique du muscle perfusé, (ii) de la libération de citrate dans l'effluent coronarien, (iii) des niveaux tissulaires des intermédiaires du cycle de Krebs, et (iv) de la contribution relative des substrats énergétiques à la synthèse du citrate, notamment l'oxydation des acides gras et des glucides, ainsi que la décarboxylation et la carboxylation du pyruvate.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Le phénotypage métabolique du muscle cardiaque, autant en conditions physiologiques que pathologiques, fut l'objectif commun aux diverses subdivisions de cette recherche. Les premières sections de ce chapitre, soient les sections 1 à 4, consistent principalement en un survol des connaissances actuelles reliées aux sujets de cette étude, autant sur le plan métabolique que pathologique. Les sections suivantes, soient les sections 5 à 9, traitent de façon plus spécifique des notions théoriques et des approches méthodologiques directement associées aux questionnements de cette thèse.

I.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

À l'aube du 21^e siècle, malgré des décennies de recherches et des améliorations considérables dans le domaine de la chirurgie cardiaque et des interventions pharmacologiques, les maladies cardiovasculaires demeurent une des principales causes d'hospitalisations, de morbidités et de mortalités au Canada, de même que dans les autres pays industrialisés. On dénombre dans les pays industrialisés des millions de patients atteints de maladies cardiaques, et comme conséquence directe des milliards de dollars consacrés en soins de santé annuellement. Des études de santé publique estiment qu'en 2020, la défaillance cardiaque aura atteint la première position des causes de décès à l'échelle mondiale (*Lopez et al., 1998*). La situation est d'autant plus critique du fait qu'aux nombreux problèmes cliniques s'ajoute la complexité d'intégration des nouvelles notions sur les mécanismes génétiques, cellulaires et moléculaires, d'adaptation ou de mauvaise adaptation du cœur face aux changements environnementaux (*Taegtmeyer et al., 1999*).

Ainsi, la compréhension des finesses du métabolisme cardiaque, la protection du cœur hypoxique ou ischémique et la restauration des fonctions antérieures à l'épisode ischémique représentent des sujets de recherches majeurs dans le domaine de la cardiologie. Les maladies du système cardiovasculaire sont caractérisées, entre autres, par des perturbations métaboliques, lesquelles compromettent l'absorption et l'assimilation des nutriments par le cœur pour la production d'énergie nécessaire à sa contraction. Ainsi, le développement de thérapies nutritionnelles et pharmacologiques efficaces repose sur une meilleure compréhension du métabolisme des nutriments et de sa régulation dans les cellules cardiaque. En élargissant notre compréhension des divers facteurs régulant le

métabolisme des principales voies de production d'énergie, soient les glucides et les lipides, ainsi que celui des autres voies secondaires, nous pourrions contribuer à optimiser le développement de traitements métaboliques pour les patients atteints de maladies cardiaques.

Les sections ci-après présentent une vue d'ensemble des diverses notions théoriques abordées au cours de cette introduction, lesquelles s'avèrent pertinentes au sujet de la présente thèse.

I.2 LES MALADIES DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

I.2.1 Généralités

Les maladies cardiovasculaires représentent une des principales causes de décès dans tous les pays industrialisés. C'est la défaillance cardiaque qui s'avère être l'étape finale commune à la plupart des diverses formes de maladies cardiaques, tels la maladie ischémique, l'hypertension systémique, les cardiomyopathies idiopathiques, les désordres congénitaux et les atteintes reliées aux valves cardiaques. L'infarctus du myocarde représente la manifestation aiguë la plus courante des maladies des artères coronaires. L'insuffisance cardiaque, l'angine, l'hypertension et l'hypertrophie du myocarde, soient des atteintes chroniques du système cardiovasculaire, sont diagnostiquées chez environ un individu sur quatre en Amérique du Nord. L'hypertrophie du myocarde, secondaire à l'hypertension artérielle ou à la surcharge de travail imposée au muscle cardiaque, est d'ailleurs reconnue comme pouvant favoriser l'ischémie cardiaque. Ces diverses manifestations de la pathologie cardiaque seront brièvement décrites dans les sous-sections qui suivent.

I.2.2 L'ischémie et l'infarctus du myocarde

L'ischémie du myocarde est un phénomène initialement réversible qui se produit lorsqu'il y a déséquilibre entre l'apport sanguin et la demande énergétique du muscle cardiaque. Bien qu'il n'y ait encore aujourd'hui aucune définition claire, le terme « ischémie » réfère principalement à une diminution du volume de perfusion. Lorsque le déséquilibre se prolonge et que l'ischémie devient majeure, les dommages causés deviennent irréversibles et on assiste alors à la mort cellulaire. Dans le myocarde, où 40% de l'espace cellulaire total est occupé par des

mitochondries, la privation d'oxygène entraîne rapidement des lésions irréversibles (*Fawcett et al., 1969*). Toutefois, lorsque les épisodes ischémiques sont brefs (entre 2 et 10 minutes) et répétitifs, on assiste au phénomène de préconditionnement (*Reimer et al., 1986*). Ce phénomène, qui induit à la longue une tolérance à l'ischémie prolongée, est d'un grand intérêt scientifique et clinique.

L'infarctus fait référence à un foyer circonscrit de nécrose ischémique résultant d'une obstruction de la circulation sanguine dans une artère coronaire, le plus souvent par un thrombus ou un embolie. L'infarctus aigu du myocarde, ou crise cardiaque, est le résultat clinique d'une ischémie prolongée où les dommages cellulaires deviennent irréversibles (*Bing, 2001*). C'est au niveau du sous-endocarde, soit la couche cellulaire la plus vulnérable du muscle, que l'effet de l'ischémie prend naissance, puis avec le temps les dommages prennent de l'expansion et atteignent le myocarde. Des crises d'angine vont souvent précéder l'infarctus aigu du myocarde, dues à la formation intermittente de thrombus dans les vaisseaux. Lorsque le thrombus, provenant d'une plaque athéromateuse instable, vient complètement obstruer la lumière du vaisseau, on assiste alors à un infarctus du myocarde. Toutefois, si la crise cardiaque n'est pas fatale, le myocarde tente alors de compenser l'ischémie en produisant des régions hypertrophiques.

Décrites plus récemment, la sidération et l'hibernation myocardique sont également des conditions pathologiques reliées à l'ischémie. Ce sont deux états d'hypocontractilité secondaire à une altération de l'équilibre entre la perfusion, le métabolisme et la fonction contractile. La sidération est une condition qui fait suite à une ischémie généralement sévère mais de courte durée. Elle se caractérise par une dysfonction du ventricule gauche persistante après revascularisation, laquelle varie en fonction de la sévérité de la période ischémique. Toutefois, la sidération est une condition généralement dépourvue de nécrose cellulaire (*Piriou et al., 1998*). En ce qui concerne l'hibernation, le concept initial, décrit au début des années 80 par le chirurgien *Rahimtoola* (*Rahimtoola, 1982; Tubau et al., 1992*), évoque l'existence d'une hypoperfusion myocardique chronique au repos, insuffisante pour engendrer de la nécrose cellulaire puisque le myocarde diminue sa fonction contractile afin d'atteindre un équilibre stable entre la perfusion, le métabolisme oxydatif et la fonction contractile. Ainsi, l'hibernation est un moyen d'adaptation endogène du

myocarde à une diminution chronique de la perfusion tel qu'observé chez les animaux hibernants (*Ferrari et al., 1999*). Le cœur ajuste sa demande énergétique à ses apports énergétiques afin de préserver la viabilité des myocytes de telle sorte qu'il n'y a aucun signe typique d'ischémie (production de lactate, déplétion des réserves d'adénosine triphosphate (ATP) et libération de créatine kinase). D'un point de vue clinique, le concept d'hibernation myocardique réfère à un état de dysfonctionnement chronique du ventricule gauche, survenant lors d'une hypoperfusion myocardique prolongée, où la viabilité est préservée et s'améliore avec la reperfusion (*Piriou et al., 1998; Mari et al., 2002*). Ainsi, contrairement à un épisode ischémique aigu, l'ischémie chronique de l'organe hibernant engendre la formation d'une zone myocardique akinétique sans apparition de nécrose puisque la revascularisation transforme la plaque akinétique en territoire contractile (*Rahimtoola, 1989*). L'hibernation myocardique suscite de nombreux travaux de recherche fondamentale et clinique, non seulement du fait que cette pathophysiologie demeure obscure et controversée, mais aussi qu'elle représente un état du myocarde fréquemment rencontré en clinique (*Ferrari et al., 1999*). Toutefois, il n'existe à ce jour aucun modèle expérimental disponible.

Il ne fait aucun doute que tous les aspects du myocarde ischémique sont d'importants sujets de recherche, autant au niveau physiologique, biochimique que génétique. Parmi les altérations biochimiques observées, on dénote, entre autres, des modifications au niveau du métabolisme des substrats énergétiques nécessaires à la production d'énergie ainsi que des changements concernant la formation de l'oxyde nitrique, des prostacyclines et des thromboxanes (*Bing, 2001*). En effet, le maintien de la fonction contractile nécessite un apport adéquat en substrats énergétiques et en oxygène. L'ischémie engendre un déséquilibre entre l'oxydation des lipides et des glucides, lesquels sont responsables de la production d'ATP. Dans ce cas, l'oxydation des lipides et du pyruvate est réduite de telle sorte que l'ATP devient majoritairement produit par la glycolyse anaérobie. Le glycogène intracellulaire est alors mobilisé et il y a accumulation de protons et de lactate dans les cardiomyocytes. Toutefois, si l'organe est reperfusé avant l'apparition de lésions irréversibles, la récupération fonctionnelle de l'organe est possible (*Argaud et al., 2000*).

I.2.3 L'hypertension

L'augmentation persistante de la pression sanguine ou « hypertension » représente un problème majeur de santé publique chez les Nord-Américains puisqu'un adulte sur quatre est hypertendu. Parfois appelé « pathologie silencieuse », l'hypertension n'engendre que très peu de symptômes tout en causant de sérieux dommages intracorporels. En effet, l'hypertension engendre des dysfonctions endothéliales, accélère les procédés athérosclérotiques et contribue à augmenter l'instabilité des plaques athérosclérotiques (*Escobar, 2002*). Ainsi, l'hypertension est un état pathophysiologique complexe pouvant entraîner de sérieuses complications, telles que la défaillance cardiaque, la crise cardiaque, l'insuffisance rénale et la cécité (*Moore et al., 2001*). La majorité des gens ayant une pression sanguine élevée, soit plus de 95% des cas, est catégorisée comme ayant de l'hypertension essentielle, signifiant qu'il n'y a aucune cause apparente de cette élévation de la pression sanguine. En effet, ce type d'hypertension semble être déterminé par des facteurs génétiques et environnementaux, tels que l'obésité et l'excès d'alcool (*Munroe et al., 2000*). Par contre, dans 5% des cas, on identifie la cause de cette élévation de la pression sanguine, par exemple un blocage de l'artère rénale, et ce type d'hypertension est dit secondaire.

La pression sanguine est définie comme étant la pression exercée par le sang circulant dans les vaisseaux sanguins contre la paroi de ces vaisseaux. Elle dépend de deux facteurs : la quantité de sang que le cœur doit pomper, soit le débit cardiaque, et la résistance offerte à ce débit, soit la résistance périphérique. Le système nerveux central joue un rôle majeur dans la régulation de la circulation sanguine via deux types de nerfs. Le système nerveux sympathique entraîne une augmentation du rythme cardiaque tandis que le système nerveux parasympathique engendre l'effet contraire. Les nerfs du système nerveux parasympathiques sont davantage impliqués au niveau du cœur tandis que les nerfs du système nerveux sympathique sont également responsables du contrôle du tonus des vaisseaux sanguins. Les nerfs sympathiques transmettent leur message aux cellules musculaires du cœur et des artères en relâchant de la norépinéphrine. La liaison de la norépinéphrine aux récepteurs adrénergiques membranaires des cellules musculaires enclenche une cascade de signalisation qui initie le processus de contraction. Il existe deux types de récepteurs adrénergiques, soient les récepteurs

α et les récepteurs β . Les récepteurs α , principalement localisés sur les cellules musculaires de la paroi des artérioles, entraînent suite à leur stimulation une contraction musculaire et ainsi une constriction des artérioles. Les récepteurs β sont localisés à divers sites, mais principalement au niveau du cœur où leur stimulation engendre des effets inotropes et chronotropes. On les retrouve également au niveau du rein où ils stimulent l'efflux de rénine. Cette dernière joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine. Elle n'a pas d'effet direct sur la pression sanguine mais plutôt via la formation d'angiotensine I. Grâce au système de conversion de l'angiotensine, l'angiotensine II formée exerce un effet très puissant sur la constriction des artérioles augmentant ainsi la pression sanguine.

En effet, le système rénine-angiotensine semble être un des systèmes endocriniens impliqués dans le développement, le maintien et l'établissement de l'hypertension primaire. Cette implication majeure du système rénine-angiotensine est supportée par le fait que plusieurs pharmacothérapies (exemple : captopril, enalapril, losartan, valsartan, eprosartan) ayant pour but d'inhiber la formation ou l'action de l'angiotensine II via une inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou de ses récepteurs (antagonistes du récepteur de l'angiotensine de type 1), constituent un traitement efficace pour de nombreux cas d'hypertension (*Boucher et al., 2002; Ruilope et al., 2003*). De plus, ces agents pharmacologiques réduisent la pression systolique chez le modèle animal d'hypertension, c'est-à-dire le rat SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) (*Tea et al., 1999; Tea et al., 2000*). Il est à noter que le captopril fut le premier inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine approuvé pour une utilisation clinique (*Swislocki et al., 1999*).

Par ailleurs, d'autres types d'agents pharmacologiques sont également utilisés comme traitement dont les bloqueurs des canaux calciques, les diurétiques et les bloqueurs des récepteurs α et β -adrénergiques (*Phillips et al., 2001; Stanley et al., 2002*). Les récepteurs adrénérgiques sont la cible de deux principales classes d'agents pharmacologiques entraînant une baisse de la pression sanguine, soient les α et les β -bloqueurs. L'effet combiné des α et β -bloqueurs est de diminuer la pression sanguine, les α -bloqueurs par une dilatation des artérioles et les β -bloqueurs par une diminution du débit cardiaque et l'arrêt de l'efflux de rénine.

Les progrès récents sur la caractérisation des gènes ont démontré que l'hypertension est une maladie multigénique. Plusieurs gènes responsables de diverses formes monogéniques d'hypertension ont récemment été identifiés. En effet, plus de vingt gènes candidats pour l'hypertension essentielle ont été rapportés, parmi lesquels on retrouve ceux du système rénine-angiotensine (*Myerson et al., 2001*). De nombreux groupes de recherche ont commencé à considérer la thérapie génique comme une approche potentielle dans le traitement de l'hypertension (*Phillips et al., 2001*). Deux approches sont à l'étude, soit une surexpression des gènes responsables de la vasodilatation (*Chao et al., 1997*), soit une diminution de l'expression des gènes responsables de la vasoconstriction (*Phillips et al., 1994*). Étant donné que la médication présentement disponible pour le contrôle de l'hypertension est dispendieuse et produit des effets de courte durée, la thérapie génique devient une alternative de choix. En résumé, l'hypertension est une maladie multifactorielle, c'est-à-dire que des facteurs hormonaux, métaboliques et génétiques sont impliqués dans l'expression de cette pathologie.

1.2.4 L'hypertrophie du myocarde

Une augmentation de la pression artérielle entraîne une surcharge de travail du muscle cardiaque et par conséquent une adaptation morphologique de l'organe. Le cœur s'hypertrophie afin de mieux répondre à la demande. Toutefois, bien que cette adaptation soit bénéfique à court terme pour l'organisme, une hypertrophie trop accentuée conduit à long terme à l'insuffisance cardiaque, à la défaillance cardiaque et à l'infarctus du myocarde (*Sambandam et al., 2002*). Le problème complexe de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) en lien avec l'hypertension artérielle a motivé de nombreuses recherches fondamentales, cliniques et épidémiologiques. De plus, l'HVG est physiopathologiquement reliée à la maladie ischémique et à l'arythmie ventriculaire. Ainsi, l'étude de l'HVG est un point de départ commun reliant plusieurs types de maladies cardiovasculaires.

L'HVG est considéré comme un mécanisme compensatoire crucial permettant une normalisation de la tension des parois vasculaires et de la consommation d'oxygène (*Wang et al., 2001*), et par le fait même, le maintien d'une fonction cardiaque stable (*Nogueira, 1999*). D'une part, elle est considérée comme purement adaptative lorsqu'elle se produit au cours des stades de croissances post-nataux ou lors

d'entraînements physiques intenses (Kelly, 2002). D'autre part, la forme pathologique de l'HVG, telle que causée par de l'hypertension, entraîne un remodelage du muscle résultant en une dysfonction contractile et ultimement en une défaillance cardiaque. Plusieurs études ont démontré, à l'aide d'électrocardiogrammes ou d'échocardiographies, une augmentation de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire lorsque l'hypertension est suivie d'HVG. De plus, il a été démontré que l'HVG est un facteur de risque plus dommageable qu'une hausse de la pression sanguine, l'âge, une maladie des artères coronaires ou un niveau élevé de cholestérol (Nogueira, 1999).

De nombreuses voies de signalisations sensibles au Ca^{2+} ont été impliquées dans l'hypertrophie du myocarde. Parmi ces voies de signalisation on retrouve, entre autres, l'activation des MAP kinases, de la protéine kinase C et de la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante. Par ailleurs, les recherches des dernières années tendent également à supporter la présence de changements dans l'expression génique des enzymes métaboliques, des protéines contractiles et des oncogènes dans certaines situations cliniques, telles que la défaillance cardiaque, l'ischémie chronique, les cardiomyopathies et l'hypertrophie (Taegtmeyer et al., 1999). De ce fait, plusieurs auteurs proposent que l'adaptation du cœur en réponse à une hypertrophie croissante implique de nombreux changements phénotypiques incluant la réactivation de gènes codant pour des protéines contractiles de types fœtales, l'induction de facteurs de croissance (TGF- β), l'expression de proto-oncogènes (c-fos) ainsi qu'un renversement de l'isoforme des protéines du sarcomère (α -MCH, β -MCH, α -actine), soit de l'isoforme adulte à l'isoforme fœtale (Tableau I) (Taegtmeyer, 2000a; Taegtmeyer et al., 2002; Montessuit et al., 1999). De même, d'un point de vue métabolique, on assiste à un renversement dans le choix des substrats pour la production d'énergie, soit d'une utilisation préférentielle des acides gras vers celle du glucose (van Bilsen et al., 1998; Young et al., 2001).

Tableau I. Changements transcriptionnels induits par l'hypertrophie cardiaque (adapté de Taegtmeyer, 2000)

| | Changements Observés |
|--|----------------------|
| <i>Protéines du sarcomère*</i> : | |
| α -MHC | ↓ |
| β -MHC | ↑ |
| α -actine cardiaque | ↓ |
| α -actine squelettique | ↑ |
| <i>Pompes ioniques</i> : | |
| α_2 -Na ²⁺ /K ⁺ -ATPase | ↓ |
| <i>Protéines du métabolisme*</i> : | |
| GLUT1 | = |
| GLUT4 | ↓ |
| M-CPT-I | ↓ |
| Créatine kinase mitochondriale | ↓ |
| <i>Facteurs de croissance</i> : | |
| TGF- β_1 | ↑ |
| TGF- β_3 | ↑ |
| <i>Proto-oncogène</i> : | |
| c-fos | ↑ |
| <i>Autres peptides</i> : | |
| ANP | ↑ |
| BNP | ↑ |

α -MHC, α -chaîne lourde de myosine; β -MHC, β -chaîne lourde de myosine; GLUT1, l'isoforme 1 du transporteur de glucose; GLUT4, l'isoforme 4 du transporteur de glucose; isoforme musculaire de la carnitine palmitoyltransférase-I; TGF- β_1 and TGF- β_3 , « transforming growth factor- β_1 and - β_3 , ANP, « atrial natriuretic peptide »; BNP, « brain natriuretic peptide »

* : gènes codant un isoforme foetal et un isoforme adulte

↑ : hausse de la transcription, ↓ : baisse de la transcription, = : aucun changement de la transcription

Toutefois, malgré le fait que de nombreuses évidences supportent que le phénotype de l'HVG implique de nombreux déterminants génétiques, peu de résultats permettent à ce jour d'identifier les gènes spécifiquement impliqués. Certaines études proposent une implication de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (*Myerson et al., 2001*), d'autres proposent des mutations aux niveaux des gènes codant pour diverses protéines du sarcomère (*Seidman et al., 2001*) ou alors plus spécifiquement du gène codant pour le PPAR α (« Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α ») (*Jamshidi et al., 2002; Kelly, 2002; Young et al., 2001*).

En résumé, l'adaptation du muscle cardiaque à une hypertrophie croissante implique des altérations au niveau de la masse des cardiomyocytes, du métabolisme énergétique et de l'expression génique. Néanmoins, bien qu'il existe de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* sur divers modèles animaux, les mécanismes d'adaptation et les voies de signalisation activées par l'hypertrophie demeurent d'importants sujets de recherche. De plus, il s'avère pertinent de noter que la majorité des investigations concernant l'hypertrophie cardiaque *in vivo* sont réalisées sur des modèles animaux. Ainsi, peu d'études rapportent l'adaptation du cœur humain, laquelle pourrait impliquer des mécanismes très différents.

I.3 Les fondements du métabolisme énergétique cardiaque

I.3.1 Généralités

Dans un premier temps, seront revues les connaissances générales concernant le métabolisme cardiaque et sa régulation en condition normoxique (sections I.3 à I.5). Dans ces sections, l'emphase sera mise sur la régulation allostérique des enzymes. De plus, une attention particulière sera portée au rôle métabolique du citrate (section I.5), puisque cette molécule s'avère être au centre des questionnements de la présente thèse. Dans un second temps, seront abordées des connaissances plus actuelles, c'est-à-dire les nouvelles notions concernant la régulation génique du métabolisme cardiaque (section I.6). Dans un troisième temps, les altérations métaboliques, physiologiques et fonctionnels documentés dans la maladie cardiaque, plus spécifiquement lors de l'hypertension et de l'hypertrophie du myocarde, seront décrites (section I.7) de même que les agents pharmacologiques utilisés dans le traitement de la maladie ischémique (section I.8). Enfin, les diverses méthodes et techniques d'investigations du métabolisme cardiaque utilisées au cours de cette étude seront présentées (section I.9). De fait, cette dernière section inclut une description plus détaillée de l'approche choisie pour la réalisation d'une grande partie de ce projet de doctorat, soit l'utilisation de substrats marqués au carbone 13 combinée à l'analyse des isotopomères de masse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM).

Cette recension, basée entre autres sur de nombreux articles de revues ainsi que sur la littérature récente, n'est nullement exhaustive mais tente simplement de faire un survol des éléments clés concernant le sujet de cette étude.

I.3.2 Les substrats énergétiques du cœur

Un apport continu en oxygène et en substrats exogènes est nécessaire au bon fonctionnement du muscle cardiaque. Livrés au cœur par la circulation coronarienne, l'oxygène et la majorité des nutriments permettent une activité constante du cycle de l'acide citrique (CAC) et donc une production d'énergie sous forme d'ATP. Le cœur est de nature omnivore (Taegtmeyer, 1985a), c'est-à-dire qu'il peut utiliser simultanément une variété de substrats, tels le glucose, le lactate, les acides gras, les corps cétoniques et les acides aminés (Ballard et al., 1960, Bing et al., 1955, Blain et al., 1956, Liedtke, 1981, Taegtmeyer et al., 1999). La quantité et la qualité des substrats disponibles pour le métabolisme cardiaque sont déterminées par l'état nutritionnel et l'activité physique de l'organisme en entier. Le muscle cardiaque doit continuellement s'adapter afin de maintenir sa constante contraction permettant de subvenir à ses propres besoins ainsi qu'à tous les autres tissus de l'organisme. La Figure 1 illustre les principales voies métaboliques impliquées dans la conversion de ces substrats en énergie.

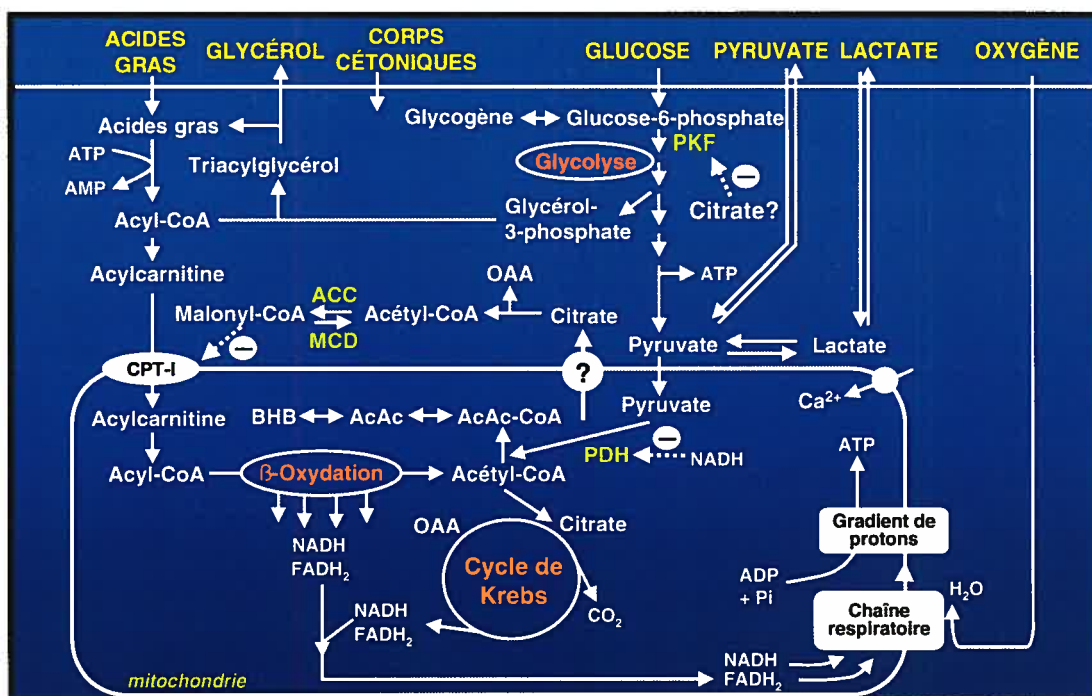


Figure 1. Principales voies métaboliques impliquées dans la conversion des substrats énergétiques en énergie dans le cœur (adapté de Lerch, 1993)

ACC, acétyl-CoA carboxylase; CPT-I, carnitine palmitoyl transférase-I, MCD, malonyl-CoA décarboxylase; OAA, oxaloacétate; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFK, phosphofructokinase

1.3.2.1 Les substrats exogènes

Le cœur utilise normalement une variété de substrats exogènes, tels que le glucose, le lactate, les acides gras, les corps cétoniques, soient l'acétoacétate (AcAc) et le β -hydroxybutyrate (β -HB), et les acides aminés. La contribution relative de ces substrats à la production d'énergie dépend de nombreux facteurs dont les concentrations plasmatiques de ces substrats et du niveau de travail contractile (*Bing, 1955; Stanley et al., 1997b*). De plus, l'entrée de ces substrats dans la cellule, aussi bien que la synthèse et la dégradation des réserves de substrats emmagasinés, sont contrôlées par les fluctuations hormonales (insuline, glucagon et catécholamines) ainsi que par l'état physiologique du myocarde lequel est influencé par la charge de travail imposée et la disponibilité en oxygène (*Keul et al., 1965, Krebs et al., 1971, Taegtmeyer et al., 1985b*).

Dans un cœur adulte à l'état nourri, la majorité de l'énergie provient de l'oxydation des glucides, c'est-à-dire le glucose et le lactate, alors que l'oxydation des acides gras prédomine en période post-prandiale (~70%) de même que lors du jeûne (*Neely et al., 1974; van der Vusse et al., 1992; Lopaschuk et al., 2002b; Hauton et al., 2001; Wolff et al., 2002*). Toutefois, la captation du lactate et du glucose par le cœur *in vitro* et *in vivo* augmente en fonction de la charge de travail imposée (*Gertz et al., 1988; Taegtmeyer et al., 1980*). Ainsi, suite à un exercice intense, le lactate, dont la concentration plasmatique est augmentée, peut devenir le principal substrat énergétique (*Stanley et al., 1997b*). De plus, la contribution des corps cétoniques, lesquels sont produits par le foie lorsque l'approvisionnement en acides gras devient abondant et excède la capacité du foie à les oxyder complètement par le CAC, augmente progressivement alors que se prolonge la période de jeûne. La contribution des corps cétoniques est également substantielle dans toutes autres circonstances où leur concentration plasmatique est augmentée, tel qu'un diabète non-contrôlé, une période d'exercice ou au cours du dernier trimestre de la grossesse. Toutefois, il subsiste toujours une faible activité d'oxydation des glucides, même dans des conditions où la concentration exogène en acides gras et en corps cétoniques est élevée.

Quant aux acides aminés plasmatiques, ils ne sont pas ou peu captés par le cœur en condition aérobie, par contre leur captation, principalement le glutamate, l'aspartate

et les acides aminés à chaînes branchées (*Pisarenko, 1996; Yamada et al., 1993*), devient substantielle lorsque l'oxygène est limitant. Cette utilisation des acides aminés pourrait être associée à une amélioration de l'état énergétique du cœur ischémique ou hypoxique (*Fréminet et al., 1980a; Fréminet et al., 1980b; Jessen et al., 1993; Sundqvist et al., 1994; Taegtmeyer, 1978; Takala et al., 1980; Wiesner et al., 1986; Wiesner et al., 1988*).

Un renversement dans le métabolisme énergétique cardiaque, c'est-à-dire une diminution de l'utilisation des acides gras comme source énergétique préférentielle en faveur du glucose, peut se produire normalement en réponse à divers changements de conditions, soit physiologiques ou nutritionnelles. Par exemple, à l'état fœtal, c'est-à-dire dans un environnement considéré comme relativement hypoxique, le cœur privilégie le catabolisme du glucose et du lactate pour sa production d'énergie. La transition vers une oxydation privilégiée des acides gras s'amorce au tout début de la période post-natale, au cours de laquelle la diète est principalement composée de lait maternel riche en lipides. Par ailleurs, un réarrangement métabolique peut également être engendré par les processus pathophysiologiques qui accompagnent l'hypertrophie, la défaillance et l'ischémie cardiaque (*Sack et al., 1998; Barger et al., 2000*).

1.3.2.2 Les substrats endogènes

Dans l'organisme d'un mammifère sain, les acides gras, emmagasinés principalement dans le tissu adipeux sous forme d'esters de triglycérides, constituent la réserve principale de substrats pour un bon nombre de tissus et d'organes. Ils sont fournis au cœur majoritairement par la circulation sanguine, car la capacité des cellules cardiaques à synthétiser *de novo* des acides gras est très faible (*Gilbertson, 1977*).

Les glucides d'importance majeure pour le métabolisme énergétique cardiaque dans des conditions physiologiques sont le glucose et le lactate, comme substrats exogènes, et le glycogène, comme substrat endogène. Le glycogène est emmagasiné dans le cytoplasme des cellules cardiaques sous forme de gros granules. Il occupe 2% du volume de la cellule adulte et 30% du volume des cardiomyocytes fœtaux ou nouveaux-nés (*Taegtmeyer et al., 1999*). Des études de dilution isotopique chez l'humain ont démontré que lorsque les acides gras sont

préférentiellement utilisé par le cœur, ce dernier continu à capter du glucose pour synthétiser du glycogène (*Wisneski et al., 1985; Wisneski et al., 1990*). En effet, contrairement au foie et aux muscles squelettiques, le muscle cardiaque augmente sa synthèse de glycogène en période de jeûne. Ceci qui est en accord avec le principe général stipulant que les acides gras, soit le substrat énergétique prédominant en période de jeûne, inhibent davantage la glycolyse que la captation du glucose. Ainsi, dans ces conditions le métabolisme du glucose-6-phosphate (G6P) est principalement redirigé vers la synthèse de glycogène (*Taegtmeyer et al., 1999*). Lors d'une période d'exercice, le glycogène est un substrat énergétique important pour le cœur (*Gollnick et al., 1973*).

I.4 Le métabolisme cardiaque et sa régulation

I.4.1 Généralités

Dans cette section, il sera question des voies métaboliques empruntées en condition normoxique par chacun des substrats métaboliques mentionnés précédemment. Les notions reliées (i) au transport, (ii) à l'oxydation, et (iii) aux sites spécifiques de régulations de ces substrats seront présentées. Les Figures 1, 2 et 6 font état des principales voies métaboliques impliquées dans la conversion de ces substrats en énergie, alors que les Tableaux V et VI résument les réactions impliquées et la quantité d'ATP produite à partir de ces substrats.

Le terme métabolisme vient du grec et signifie « changement ». Le métabolisme cardiaque est caractérisé par un grand nombre de réactions interreliées, catalysées par des enzymes hautement régulées qui, ensembles, orchestrent les besoins énergétiques du muscle cardiaque. La balance énergétique du cœur est assurée grâce à des mécanismes complexes de régulation qui équilibrent la vitesse d'oxydation du glucose et des acides gras selon les besoins énergétiques du cœur (*Kantor et al., 1999*). Ainsi, le bon fonctionnement du cœur est rendu possible grâce à un système interactif complexe de protéines, de bases puriques, de membranes, d'ions et de signaux moléculaires. De plus, le cœur possède une grande capacité d'adaptation dès le moindre changement environnemental. De fait, il existe deux types de mécanismes de régulation, soient les mécanismes de régulation à court terme et ceux à long terme. Un mécanisme d'action à court terme se produit de façon instantanée et cette adaptation immédiate implique des réactions dont les

mécanismes sont déjà en place dans l'organe, soit une modulation post-traductionnelle de l'activité d'enzymes régulatrices. Ces modulations peuvent être de divers types telles qu'une régulation allostérique, une modification covalente par phosphorylation ou simplement une translocation de l'enzyme (*Taegtmeyer, 2000a*). Ainsi, un changement dans l'activité des diverses réactions enzymatiques, que ce soit une activation ou une inhibition, est un moyen d'adaptation à court terme. À l'inverse, les mécanismes d'adaptation à long terme impliquent des réactions nécessitant l'activation de l'expression de divers gènes, permettant ainsi une adaptation graduelle (*Taegtmeyer, 2000a*). En effet, la régulation génique influence à long terme le type et la quantité de protéine exprimée. Il s'avère important de mentionner que la notion de régulation génique du métabolisme cardiaque n'est apparue qu'à la fin des années 90. Les connaissances sur ce sujet sont de ce fait plus restreintes, toutefois elles évoluent très rapidement.

1.4.2 Le métabolisme des glucides et sa régulation

Le métabolisme glucidique se divise en trois grandes étapes. On retrouve d'abord la captation du glucose au niveau de la membrane extracellulaire. Le glucose capté est ensuite métabolisé dans le cytosol par la voie glycolytique puis, en dernier lieu, oxydé dans la mitochondrie. Les sections suivantes présentent ces trois étapes séparément ainsi que les points de régulation qu'elles comportent.

1.4.2.1 Le transport du glucose

La captation du glucose extracellulaire est régulée par le gradient de glucose transmembranaire ainsi que par l'activité et la concentration des transporteurs de glucose lesquels appartiennent à la famille des GLUT (« *glucose transporter* ») (*Calvani et al., 2000; Stanley et al., 2002*). La famille des GLUT sont des transporteurs spécifiques du glucose dans toutes les cellules de l'organisme. Il existe six isoformes de GLUT ayant tous une forte homologie de structure et ne différant entre eux que par leur affinité pour le glucose (*Zierler, 1999*). Dans les cardiomyocytes, on ne dénombre que trois de ces isoformes, soient les GLUT 1, 3 et 4. Ils sont situés dans la membrane du sarcolemme ou à l'intérieur de vésicules microsomaux intracellulaires (*Zierler, 1999*).

L'isoforme GLUT 1, principalement exprimé dans le myocarde foetal, est indépendant de l'action de l'insuline (*Montessuit et al., 1999*). À la naissance, l'expression de ce transporteur est régulée à la baisse simultanément avec des changements métaboliques, toutefois il demeure responsable du transport basal du glucose. L'isoforme GLUT 3 est exprimé dans le cœur adulte, mais en faible quantité. De plus, son K_m est inférieur à la concentration normale de glucose plasmatique. Le principal isoforme exprimé à la surface des cardiomyocytes adultes est le GLUT 4 (*Depré et al., 1998b; Depré et al., 1999*). Ce transporteur est également exprimé dans les tissus adipeux et les muscles squelettiques. C'est l'insuline qui stimule sa translocation vers la membrane plasmique (*Depré et al., 1998b; Simpson et al., 1986*). Quand le transport du glucose est activé par l'insuline, l'activité de l'hexokinase devient limitante. Les substrats énergétiques disponibles, l'ischémie, l'hypoxie, de même que la charge de travail imposée au muscle cardiaque vont également moduler l'entrée du glucose dans les cellules du myocarde (*Depré et al., 1999*). Par exemple, une augmentation de la charge de travail imposée au cœur engendre une stimulation de la translocation du transporteur de glucose, en plus d'augmenter la captation de lactate (*Gertz et al., 1988*). Cette modulation permet au flux glycolytique de s'adapter à la demande énergétique. Il est à noter que certaines personnes souffrent de résistance à l'insuline, une condition qui est définie comme étant un défaut de transport du glucose à l'intérieur des cellules en réponse à une concentration normale ou même élevée d'insuline. Cette résistance peut être observée chez des patients diabétiques, des patients atteints de défaillance cardiaque ou de certains types d'hypertension (*Opie, 1998*).

1.4.2.2 La glycolyse et sa régulation

Le glucose intracellulaire libre est rapidement phosphorylé en G6P, puis dirigé vers des processus métaboliques cytosoliques, soit la voie glycolytique, soit la synthèse de glycogène ou la synthèse de ribose (*Taegtmeyer et al., 1999*). La phosphorylation du glucose en G6P, par l'hexokinase, est la première étape de régulation qui permet au glucose d'être ensuite métabolisé. On retrouve dans le cœur deux isoformes de cette enzyme : l'hexokinase I et II. L'hexokinase I se retrouve davantage chez le fœtus et nouveau-né, tandis que l'hexokinase II, sensible à l'insuline, se retrouve dans le cœur adulte. En bref, la glycolyse est un

processus biochimique mettant à profit une dizaine d'enzymes permettant la transformation du G6P en pyruvate et éventuellement en lactate via la lactate déshydrogénase (LDH) (Figure 2). Le produit final de la glycolyse est le pyruvate. La réduction du pyruvate en lactate, qui reforme le NAD^+ , est prépondérante en condition anaérobique.

La vitesse du flux glycolytique peut être altérée par la disponibilité en substrats ainsi que par la présence d'hormones, telles l'insuline et l'adrénaline (*Depré et al. 1998a*). Par ailleurs, la voie glycolytique comporte plusieurs sites de contrôle. Les principaux sites de régulation se situent au niveau de la 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Tableau II) (*Depré et al., 1998a*). La PFK-1, un des deux isoformes de la PFK, catalyse la phosphorylation du fructose-6-phosphate (F6P) en fructose-1,6-biphosphate (F1,6BP), représentant la première étape irréversible de la glycolyse. Étant donné la présence d'une régulation allostérique complexe, la conversion du F6P en F1,6BP est une étape limitante de la voie glycolytique. De fait, plusieurs effecteurs allostériques activent la PFK-1, tels le F6P, l'ADP, le Ca^{2+} et le fructose-2,6-biphosphate (F2,6BP) ou l'inhibent, tels l'ATP, le citrate cytosolique et les protons (Figure 2 et Tableau II). Dans des conditions normoxiques, le F2,6BP est le principal activateur de la PFK-1.

Tableau II. Principaux sites de régulation de la glycolyse

| Sites de régulation | Modulateurs/Effecteurs | |
|---------------------|------------------------|---------------------|
| | Positifs | Négatifs |
| PFK-1 | F6P | Citrate cytosolique |
| | ADP | ATP |
| | Ca^{2+} | Protons |
| | F2,6BP | |
| GADPH | NAD^+ | NADH |
| | | Protons |

PFK-1, phosphofructokinase-1; GADPH, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; F6P, fructose-6-phosphate; F2,6BP, fructose-2,6-biphosphate

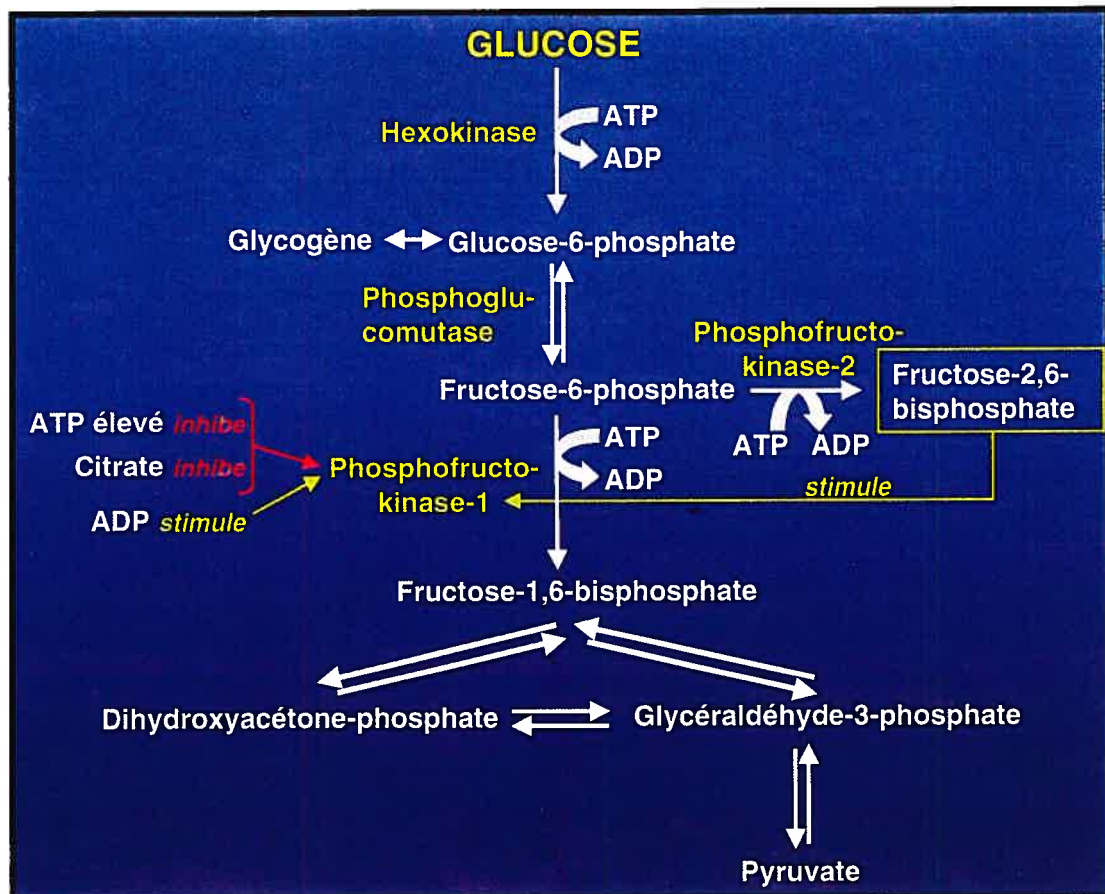


Figure 2. Aperçu général des principales étapes de la glycolyse et des régulateurs de la phosphofruktokinase-1 (PFK-1) (adapté de Lodish et al., 2000)

La GAPDH catalyse la transformation, par oxydation et par phosphorylation, de la glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate. Comme c'est le cas pour la plupart des déshydrogénases, la GAPDH est inhibée par de fortes concentrations de NADH et de protons (Tableau II).

Le G6P peut également être dirigé vers la synthèse du glycogène. La vitesse de synthèse du glycogène est modulée par la concentration en G6P ainsi que par l'activité de la glycogène synthétase, laquelle est régulée par l'insuline. L'insuline stimule le flux glycolytique et la synthèse du glycogène, contrairement à l'adrénaline qui favorise la glycogénolyse.

En résumé, le tableau présenté ci-après fait état des diverses conditions physiologiques et pathologiques ayant une influence sur la captation de glucose, le contenu cellulaire en glycogène et l'activité de la PFK-1 (Tableau III).

Tableau III. Conditions physiologiques et pathologiques ayant une influence sur la captation du glucose, le contenu cellulaire en glycogène et l'activité de la PFK-1 (Opie, 1998)

| Conditions | Captation de glucose | Contenu en glycogène | Activité de la PKF |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Augmentation de la charge de travail | + | ↓ | + |
| Agents inotropiques | + | ↓ | + |
| État nourri, Insuline | + | ↑ | + |
| Jeûne, Hyperlipidémie | - | ↑ | - |
| Hypoxie, Ischémie légère | + | ↓ | + |
| Ischémie sévère | - | ↓ | - |

+, stimulation; -, inhibition; ↓, baisse du contenu; ↑, hausse du contenu

1.4.2.3 L'oxydation du lactate et du pyruvate.

Dans un cœur sain au repos, le lactate capté de la circulation sanguine est une source majeure de formation de pyruvate suite à son oxydation par la LDH. En effet, 50% du pyruvate oxydé *in vivo* provient du lactate. Toutefois, il convient de mentionner certaines particularités liées au métabolisme du lactate dans le cœur. Des études isotopiques, réalisées *ex vivo* et *in vivo*, ont démontré que le muscle cardiaque capte et relargue du lactate simultanément. Pour expliquer ces résultats, il est proposé (Chatham et al., 2001a; Taegtmeyer et al., 1999) que la production de lactate dérivé de la glycolyse et l'oxydation du lactate exogène se produisent selon des voies métaboliques séparées (Figure 3). D'autres études sont toutefois nécessaires afin de préciser davantage ce concept de compartimentation du métabolisme du lactate.

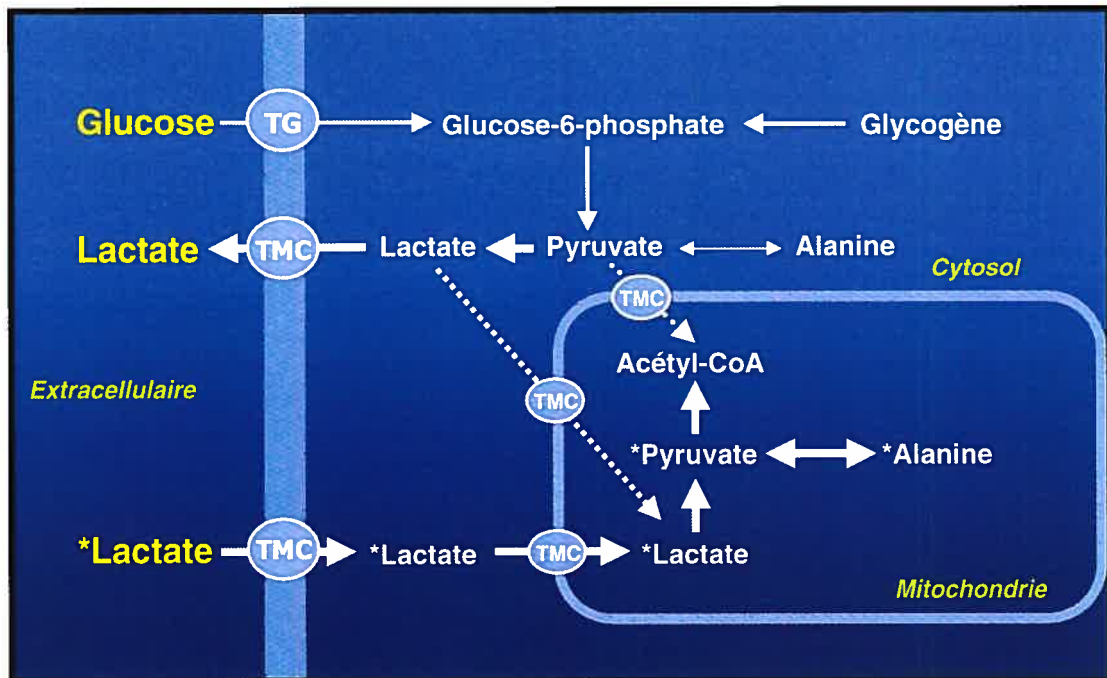


Figure 3. Représentation schématique du concept de compartimentation du métabolisme du lactate (adapté de Chatham et al., 2001a)

TG, transporteur de glucose; TMC, transporteur des monocarboxylates

*, les substrats, et leurs dérivés, marqués au carbone 13

La largeur des flèches indique la conversion préférentielle 1) du pyruvate dérivé de la glycolyse en lactate, et 2) du pyruvate dérivé du lactate exogène en acétyl-CoA

Dans des conditions normales *in vivo*, le pyruvate issu de la glycolyse ou de l'oxydation du lactate par la LDH, sera dirigé vers l'oxydation mitochondriale. Il est transporté dans la mitochondrie via un transporteur monocarboxylate où il sera décarboxylé et oxydé en acétyl-CoA par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH), ou carboxylé en oxaloacétate (OAA) ou en malate via la pyruvate carboxylase (PC) ou l'enzyme malique respectivement (Taegtmeyer et al., 1999; Mallet, 2000). La PDH est un complexe multienzymatique mitochondrial dont l'activité dépend de nombreux facteurs tels que la disponibilité en substrats, les produits formés, le travail imposé au muscle et les hormones (Tableau IV). Ce complexe, situé dans la membrane mitochondriale interne, existe sous la forme active non-phosphorylée ou inactive phosphorylée (Opie, 1998), ainsi il contribue fortement au contrôle du flux d'oxydation du glucose. En résumé, l'activité de la PDH est sous le contrôle d'un processus de phosphorylation/déphosphorylation

(kinase/phosphatase) ainsi que de plusieurs effecteurs (Figure 4) (Lopaschuk, 2001a).

Tableau IV. Conditions physiologiques et pathologiques ayant une influence sur l'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) (Opie, 1998)

| Conditions | Activité de la PDH |
|--------------------------------------|--------------------|
| Augmentation de la charge de travail | + |
| Agents inotropiques | + |
| État nourri, Insuline | + |
| Jeûne, Hyperlipidémie | - |
| Hypoxie, Ischémie légère | - |
| Ischémie sévère | - |

+, stimulation; -, inhibition

La PDH kinase (PDK), enzyme inhibant la PDH par phosphorylation réversible de la sous-unité α , est stimulée par l'acétyl-CoA et le NADH, par contre elle est inhibée par le pyruvate, l'ADP et le Ca^{2+} . On dénombre dans le cœur trois des quatre isoformes de la PDK, c'est-à-dire la PDK1, la PDK2 et l'isoforme prédominante la PDK4 (Randle et al., 1998; Sugden et al., 2001; Stanley et al., 2002; Taegtmeyer et al., 2002). L'expression des divers isoformes varie selon la composition de la diète, les fluctuations hormonales ou en période de jeûne (Wu et al., 1998; Wu et al., 1999). Il fut récemment proposé que la PDK4 facilite l'oxydation des lipides en favorisant la carboxylation du pyruvate en OAA. Selon Sugden et ses collaborateurs, une hausse de la carboxylation du pyruvate en OAA facilite l'entrée dans le CAC des acétyl-CoA dérivés de la β -oxydation via à la formation de citrate, un inhibiteur de la glycolyse (Sugden et al., 2001).

Inversement, la PDH phosphatase, enzyme activant la PDH, est stimulée par le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (Taegtmeyer et al., 1999). L'adrénaline et l'AMPc sont aussi des effecteurs positifs de la PDH. Par ailleurs, l'oxydation des acides gras et des corps cétoniques entraîne l'inactivation de la PDH via les effets produits sur les rapports [acétyl-CoA]/[CoA] et [NADH]/[NAD⁺] (Weiss et al., 1989; Sugden et al., 2001).

En résumé, la régulation à court terme de l'activité de la PDH s'effectue via (i) l'activation de la PDK par les produits de l'oxydation des acides gras et du pyruvate (acétyl-CoA et NADH) ou (ii) l'inhibition de la PDK par le pyruvate dérivé de la glycolyse ou de l'oxydation du lactate (*Calvani et al., 2000*). L'activation de la PDH stimule le métabolisme du glucose en période post-prandiale, alors que la suppression de son activité est cruciale pour la conservation du glucose en période de jeûne. Des changements dans l'activité de la PDH, dues en partie à des changements dans la proportion relative des formes phosphorylées et déphosphorylées, ont été rapportés dans de nombreuses conditions pathologiques, tels que le diabète mellitus et l'hyperthyroïdie (*Lydell et al., 2002; Wu et al., 1998*). Il est à noter que le niveau d'activité du complexe de la PDH est non seulement contrôlé par des mécanismes de régulation à court terme mais également par des mécanismes de régulation à long terme (*Wu et al., 1998*). Ces mécanismes de régulation à long terme, beaucoup moins définis et élucidés, seront abordés à la sixième section de ce chapitre.

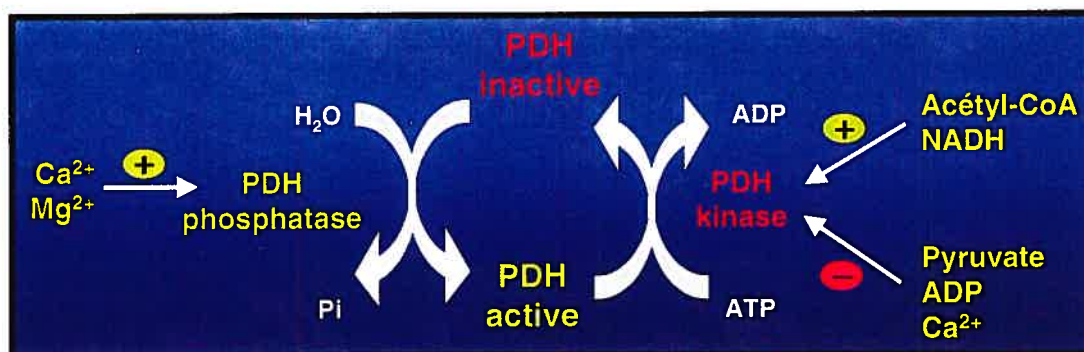


Figure 4. Régulation du complexe multienzymatique de la pyruvate déshydrogénase (PDH) (*adapté de Depré et al., 1999*)

Comparativement à la décarboxylation du pyruvate, la régulation de la carboxylation du pyruvate, via la PC ou l'enzyme malique, est peu connue. La carboxylation du pyruvate est une réaction qui contribue au maintien du pool d'intermédiaires du CAC. Ce mécanisme, qui se nomme l'anaplérose (*Comte et al., 1997a, Taegtmeyer et al., 1999*) fera l'objet d'une section séparée (section I.4.5.2).

Bien que le myocarde ait la capacité d'oxyder une grande variété de substrats pour générer l'énergie nécessaire à sa contraction, le pyruvate semble être unique de par

sa capacité d'améliorer la performance du cœur (*Russell et al., 1991*). Plusieurs études ont rapporté les effets bénéfiques du pyruvate sur la fonction contractile (*Mallet et al., 1999; Hermann et al., 1999; Mallet et al., 2000*). Administré à des concentrations physiologiques, soit 0,2 mM, le pyruvate améliore très faiblement la fonction cardiaque. Toutefois, à des concentrations supra-physiologiques de l'ordre de 5 à 10 mM, il engendre une augmentation marquée de la pression développée et de la puissance cardiaque chez l'animal et chez l'humain (*Hermann et al., 1999; Mallet, 2000*). Ainsi, le pyruvate est considéré comme un substrat cardioprotecteur. Bien que ses effets semblent faire intervenir plusieurs mécanismes, tous semblent nécessiter le métabolisme mitochondrial du pyruvate, et plus particulièrement sa carboxylation en OAA. Le pyruvate étant un substrat anaplérotique, il permet via sa carboxylation en OAA, un renouvellement des intermédiaires du cycle de Krebs du fait qu'il fournit des carbones catalytiques au cycle (*Jeffrey et al., 1996; Comte et al., 1997a*).

I.4.3 Le métabolisme des lipides et sa régulation

Le métabolisme des lipides se divise en deux grandes étapes. Les acides gras sont d'abord captés au niveau de la membrane extracellulaire puis transférés dans la matrice mitochondriale où ils seront dégradés par les enzymes de la β -oxydation. Les sections suivantes décrivent ces deux étapes du métabolisme lipidique ainsi que les principaux points de régulation qu'elles comportent.

I.4.3.1 Le transport des lipides

Les acides gras utilisés par le cœur sont principalement les acides gras à chaîne longue (AGCL), et plus particulièrement le palmitate, composé de seize carbones (C-16:0) et l'oléate, composé de dix-huit carbones et d'une insaturation (C-18:1). Étant de nature amphiphile, les acides gras libres circulent dans le plasma principalement complexés à l'albumine, laquelle augmente leur solubilité. On dénombre six à huit sites de liaison pour les acides gras par molécule d'albumine. Les acides gras peuvent également être livrés au muscle cardiaque sous forme de triglycérides présents dans les chylomicrons et les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) (*Evans et al., 2000*). La lipoprotéine lipase, localisée du côté luminal des cellules endothéliales des capillaires, hydrolyse les triglycérides afin qu'ils puissent pénétrer la cellule. Les mécanismes qui régissent le transport des acides

gras libres à travers les membranes cellulaires demeurent un sujet controversé. Longtemps la croyance fut que les acides gras traversent le sarcolemme via une diffusion passive (*van der Vusse et al., 1992; Zakim, 1996*). Aujourd'hui, il est proposé que les acides gras libres pénètrent également la membrane cellulaire via des transporteurs : les glycoprotéines transmembranaires (*van der Vusse et al., 2002; Finck et al., 2002*). Trois types de transporteurs ont été identifiés : la protéine de liaison aux acides gras de la membrane plasmique (FABP_{pm} : «plasma membrane fatty acid-binding protein», 43-kDa), la protéine de transport des acides gras (FATP : «fatty acid transport protein», 62-kDa) et la translocase des acides gras (FAT : «fatty acid translocase», 88-kDa (homologue du CD36 humain)), (*Schaap et al., 1998; Barger et al., 2000; Glatz et al., 2001; Hauton et al., 2001; Luiken et al., 2001*).

Une fois dans le cytoplasme, les acides gras se lient aux protéines de liaison des acides gras (FABP_c : «cytoplasmic fatty acid-binding protein») et sont activés au niveau de la membrane mitochondriale externe en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (*Barger et al., 2000*). Les acyl-CoA, non perméables à la membrane mitochondriale, sont alors transportés dans la mitochondrie grâce à un complexe enzymatique comprenant la carnitine palmitoyl transférase-I (CPT-I), la carnitine-acylcarnitine translocase, et la carnitine palmitoyl transférase-II (CPT-II) (Figure 5) (*Park et al., 1998; Stanley et al., 2002*). La CPT-I, située dans la membrane mitochondriale externe, catalyse la première étape du processus de transport des acides gras en transférant le groupement acyl du CoA à la carnitine. L'acyl-carnitine ainsi formée traverse la membrane mitochondriale interne via la carnitine-acylcarnitine translocase couplée à la CPT-II. Cette dernière régénère l'acyl-CoA suite au transport du groupe acyl-carnitine dans la matrice mitochondriale (*Calvani et al., 2000*).

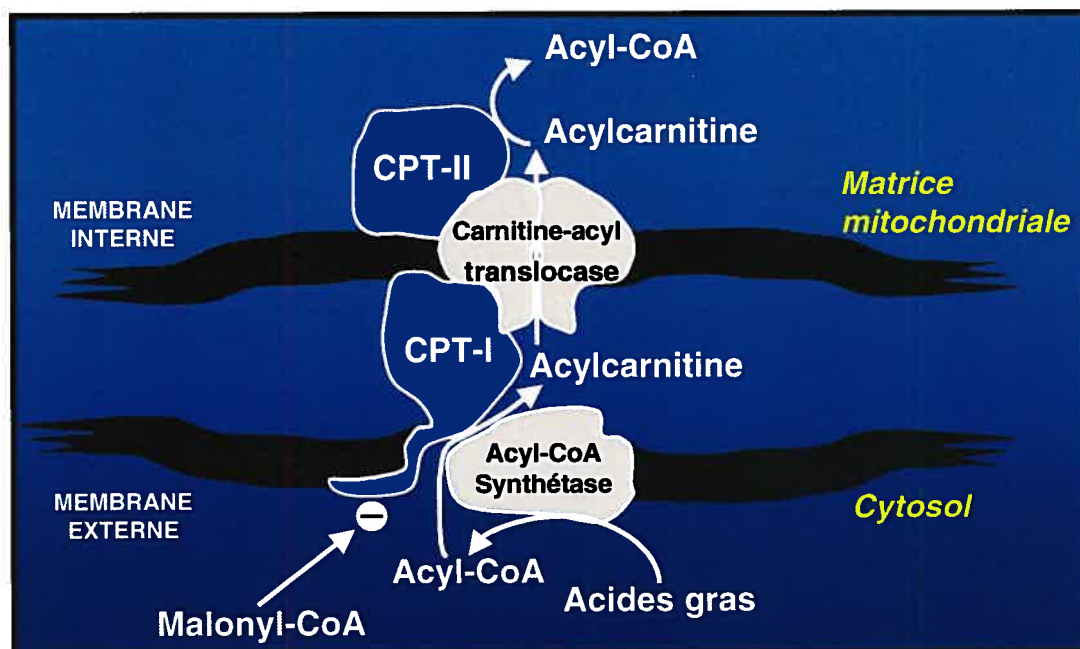


Figure 5. Représentation schématique du système de transport mitochondrial des acyl-CoA à chaîne longue (adapté de Park et al., 1998)

CPT-I et -II, carnitine palmitoyl transférase-I et -II

La CPT-I est une enzyme clé dans le processus d'oxydation des acides gras et une étape limitante pour le transfert des acyl-CoA dans la mitochondrie (McGarry et al., 1983; McGarry et al., 1989; Calvani et al., 2000). Il existe dans l'organisme deux isoformes distincts de la CPT-I (foie et muscle), l'isoforme L ou α (L-CPT-I ou CPT-I α : ~88 kDa), caractérisé pour la première fois au niveau du foie et l'isoforme M ou β (M-CPT-I ou CPT-I β : ~82 kDa), caractérisé pour la première fois au niveau du muscle (Kim et al., 2002; Barger et al., 2000). Dans le myocarde adulte les deux types d'isoformes sont présents avec une prédominance (~90-98% de l'activité) de l'isoforme M-CPT-I (Brown et al., 1995; Barger et al., 2000). La carnitine, agissant comme accepteur du groupement acyl de l'acyl-CoA, est un cofacteur essentiel de la CPT-I. Lorsque dans le myocarde le contenu en carnitine diminue l'oxydation des acides gras à chaîne longue diminue également.

Il est à noter que la carnitine et la carnitine-acylcarnitine translocase sont non seulement impliquées dans le transport mitochondrial des acides gras mais également dans l'exportation de groupements acétyls hors de la matrice mitochondriale (Calvani et al., 2000). La carnitine acétyltransférase catalyse la formation d'acétylcarnitine via le transfert de groupements acétyls de l'acétyl-CoA à

la carnitine. L'acétylcarnitine ainsi formée est ensuite transportée à l'extérieur de la mitochondrie par la carnitine-acylcarnitine translocase (voir Figure 9). Dans le cytosol, l'acétylcarnitine est reconvertie en acétyl-CoA par la carnitine acétyltransférase cytosolique (*Calvani et al, 2000; Stanley et al., 2002*).

Contrairement aux AGCL, les acides gras à chaîne moyenne traversent directement la membrane interne de la mitochondrie sans subir de régulation. En effet, ces derniers sont directement activés dans la matrice mitochondriale par une acyl-CoA synthétase à chaîne moyenne. Ainsi, contrairement aux AGCL, la β -oxydation des acides gras à chaîne moyenne n'est pas régulée au niveau de la CPT-I. Toutefois, les acides gras à chaîne moyenne, tel que l'octanoate, un composé de huit carbones (C-8:0), ne sont pas des substrats énergétiques physiologiques.

1.4.3.2 La β -oxydation des acides gras et sa régulation

Dans le cœur, la capacité d'entreposage des acides gras est très limitée. Spécifiquement, chez l'humain, environ 80% des acides gras captés sont rapidement transportés aux myocytes et oxydés dans les mitochondries. La balance, soit environ 20%, est convertie en réserves de triglycérides (*Wisneski et al., 1987*). Il est donc primordial que la captation et l'oxydation des acides gras soient finement couplée (*Barger et al., 2000*).

Une fois dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA passent à travers le complexe multienzymatique de la β -oxydation afin de produire des unités acétyl-CoA. Chaque tour du complexe produit un acétyl-CoA, un NADH et un FADH₂. La β -oxydation des acides gras en acétyl-CoA est un processus principalement mitochondrial qui dépend de la présence d'oxygène, bien que le cœur compte également certaines voies peroxysomales (*Barger et al., 2000*). Plusieurs évidences expérimentales indiquent que le principal site de régulation de l'oxydation des acides gras dans le cœur se trouve au niveau de l'entrée de ces derniers dans la mitochondrie. Tel que décrit ci-dessus, l'enzyme clé impliquée dans ce processus est la CPT-I, laquelle est inhibée par le malonyl-CoA. Cette inhibition de l'oxydation des AGCL par le malonyl-CoA sera discutée en détails à la section 1.5.3.3 du présent chapitre. De plus, il semble que l'activité de deux enzymes du complexe multienzymatique de la

β -oxydation, c'est-à-dire la 3-oxoacyl-CoA thiolase et l'acyl-CoA déshydrogénase, soit modulée par le rapport [acétyl-CoA]/[CoA]. De fait, ces enzymes sont activées suite à une diminution du rapport [acétyl-CoA]/[CoA] engendrée par une augmentation de la charge de travail imposée au cœur (*Oram et al., 1973; Neely et al., 1976*).

I.4.4 Le métabolisme des corps cétoniques

Les deux principaux corps cétoniques produits par le catabolisme des acides gras dans le foie sont l'AcAc et le β -HB (*Mitchell et al., 1995*). Ils sont ensuite exportés vers les tissus périphériques, en particulier le cerveau. En conditions physiologiques, les corps cétoniques sont des substrats énergétiques peu utilisés par le cœur comparativement aux glucides et aux lipides. Toutefois, lorsque la glycémie baisse, les corps cétoniques sont exportés du foie et dirigés vers le muscle cardiaque où ils serviront de source d'énergie.

Lors de la dégradation des corps cétoniques en acétyl-CoA, la β -hydroxybutyrate déshydrogénase oxyde le β -HB en AcAc. Puis, la thioacyltransférase cardiaque transfère le groupe CoA du succinyl-CoA à l'AcAc, pour former de l'acétoacétyl-CoA et du succinate. L'acétoacétyl-CoA thiolase catalyse ensuite la scission de l'acétoacétyl-CoA en deux molécules d'acétyl-CoA qui pourront entrer dans le CAC. Toutes ces réactions enzymatiques étant réversibles, il est également possible de former du β -HB à partir de deux molécules d'acétyl-CoA. En effet, sous certaines conditions métaboliques des corps cétoniques peuvent être relargués par les cellules du cœur, et ce procédé se nomme pseudocétogénèse (*Weidemann et al., 1969; Ruderman et al., 1974; Fink et al., 1988*).

I.4.5 Le CAC : un carrefour métabolique

I.4.5.1 Les réactions du CAC

La combinaison d'une molécule d'acétyl-CoA et d'une molécule d'OAA entraîne la formation d'une molécule de citrate, premier intermédiaire du CAC, via la citrate synthase. Il y a ensuite oxydation de l'acétyl-CoA par les enzymes du cycle tel que présenté à la Figure 6.

L'acétyl-CoA est issu de l'oxydation mitochondriale de tous les substrats énergétiques exogènes, soient (i) les glucides via le complexe de la PDH, (ii) les acides gras via la thiolase, (iii) les corps cétoniques via l'acétoacétyl-CoA thiolase ou alors (iv) des enzymes métabolisant certains acides aminés. Toutefois, seuls le glucose et le lactate sont des précurseurs de l'OAA suite à leur conversion respective en pyruvate par la glycolyse et la réaction catalysée par la LDH. La carboxylation du pyruvate par la pyruvate carboxylase génère ensuite l'OAA. Le CAC produit des équivalents réduits nécessaires à la phosphorylation oxydative mitochondriale, c'est-à-dire la condensation d'un ADP et d'un phosphate inorganique permettant la régénération d'ATP par la chaîne de transport des électrons (Lopaschuk et al., 2002b).

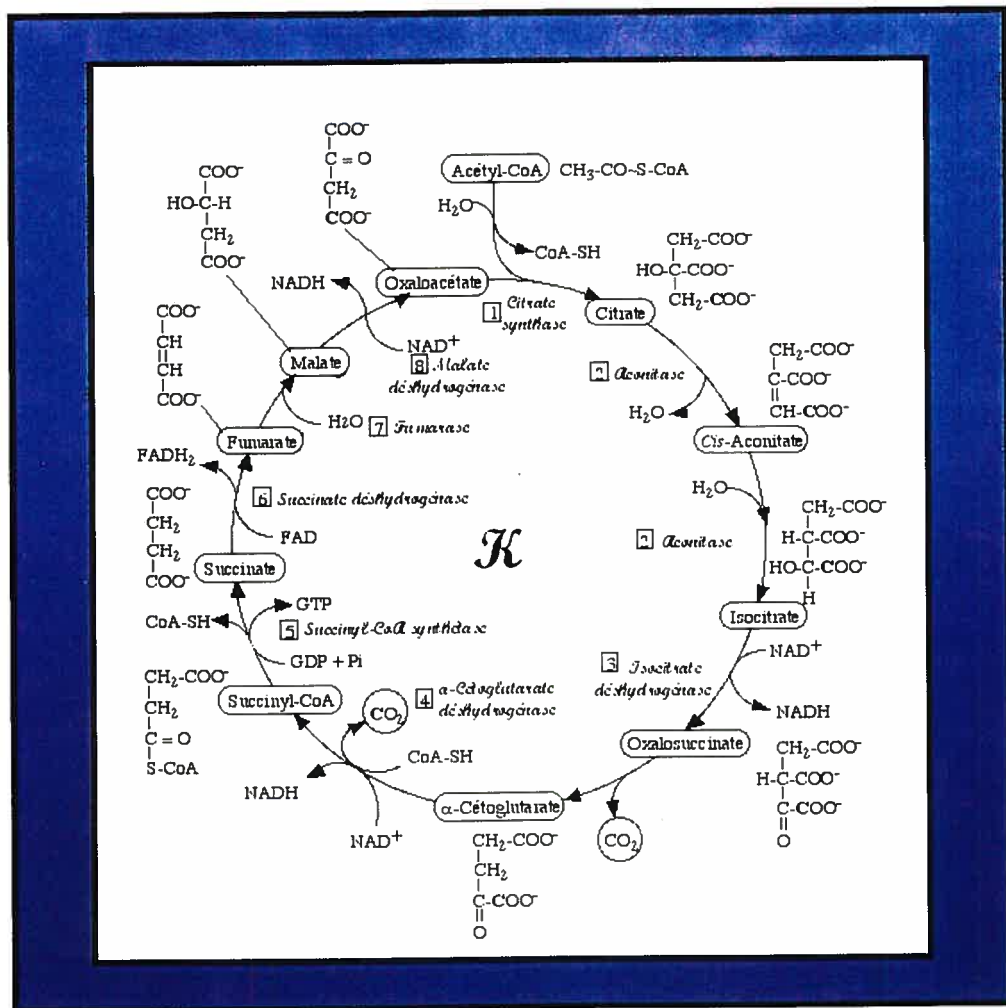


Figure 6. Aperçu général des réactions du cycle de Krebs

I.4.5.2 L'anaplérose

Les intermédiaires du CAC participent également à des réactions auxiliaires affectant le flux de carbones à l'intérieur (anaplérose) et à l'extérieur (cataplérose) du cycle (*Kornberg, 1966; Peuhkurinen et al., 1984; Comte et al., 1997a; Gibala et al., 2000*). L'anaplérose est un processus métabolique qui permet l'approvisionnement en carbones catalytiques au CAC. La demande en substrats anaplérotiques est dictée par la perte de carbones du CAC autres ceux provenant du dioxyde de carbone (*Nuutinen et al., 1981; Peuhkurinen et al., 1982*). L'existence de ces réactions anaplérotiques et cataplérotiques est illustrée par des changements rapides dans la réserve des intermédiaires du CAC (*Peuhkurinen et al., 1983*). L'ampleur de ces processus varie selon diverses circonstances, telle qu'une modification dans l'apport en substrats ou en oxygène. De fait, l'importance des réactions anaplérotiques dans le CAC a été découverte lorsqu'une détérioration rapide de la fonction contractile a été observée dans un cœur perfusé en présence de corps cétoniques comme seul substrat énergétique (*Taegtmeyer et al., 1980; Taegtmeyer, 1983*). Cette baisse de la fonction pouvait par ailleurs être renversée par l'ajout de glucose et de pyruvate (*Russell et al., 1991*).

Parmi les substrats anaplérotiques, on retrouve entre autres le pyruvate, le succinate, le propionate, le glutamate, l'aspartate et les acides aminés à chaîne branchée (*Sundqvist et al., 1994; Takala et al., 1980; Bittl et al., 1983; Bungler et al., 1989; Cairns et al., 1997; Laplante et al., 1997; Panchal et al., 2000; Panchal et al., 2001; Martini et al., 2003*). Ainsi, par exemple, la carboxylation du pyruvate, via la PC ou l'enzyme malique, permet un renouvellement des intermédiaires du CAC (*Jeffrey et al., 1996; Comte et al., 1997a*). La figure présentée ci-après fait état des voies anaplérotiques retrouvées dans le cœur et le muscle squelettique (Figure 7).

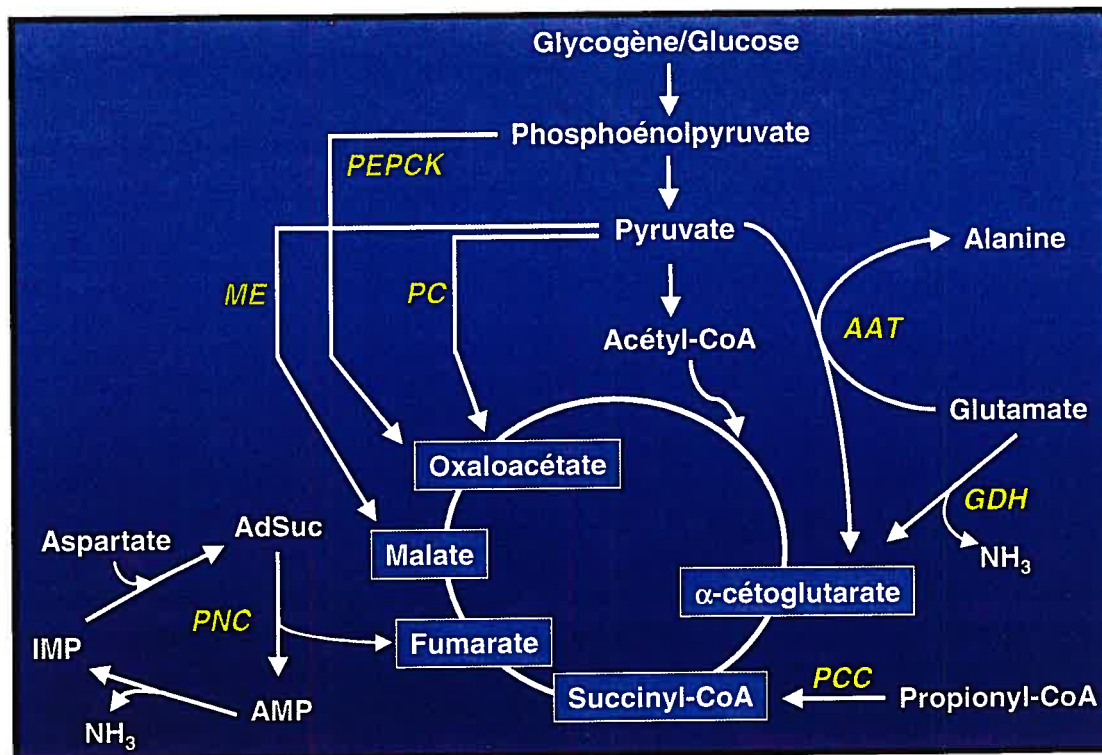


Figure 7. Réactions anaplerotiques dans le muscle cardiaque et squelettique
(adapté de Gibala et al., 2000)

AMP, adénosine monophosphate; AdSuc, adénosuccinate; AAT, alanine aminotransférase; GDH, glutamate déshydrogénase; IMP, inosine monophosphate; ME, enzyme malique; PC, pyruvate carboxylase; PCC, propionyl-CoA carboxylase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PNC, cycle des purines.

1.4.5.3 Les navettes et les transporteurs

Mis à part l'anaplérose, il existe un autre processus métabolique jouant un rôle essentiel au bon fonctionnement de l'ensemble des réactions du CAC impliquées dans la production d'énergie. Il s'agit du système de navettes permettant le transfert des équivalents réduits entre le cytosol et la mitochondrie, la membrane mitochondriale interne étant imperméable aux NADH (Safer et al., 1973; Safer, 1975). Ce processus est permissif du fait qu'il n'est pas inclus dans la stœchiométrie globale des réactions d'oxydation.

Les systèmes de navettes impliquent, entre autres, deux réactions où interviennent les acides aminés aspartate et glutamate. Ces réactions sont catalysées par des transaminases, des enzymes très actives dans le tissu cardiaque (Pisarenko et al.,

1995). La navette malate-aspartate, d'abord découverte dans le foie, est d'une importance majeure dans le métabolisme cardiaque. Cette navette fonctionne grâce à deux transporteurs : le transporteur des dicarboxylates, lequel échange le malate et l' α -cétoglutarate, et le transporteur aspartate-glutamate, lequel échange ces deux acides aminés. Le résultat global de la navette malate-aspartate est le transfert d'ions H^+ et de NADH, du cytosol où ils sont produits, jusqu'à l'intérieur de la mitochondrie où ils sont utilisés par la chaîne de transport des électrons pour la phosphorylation oxydative. Ainsi, ces transporteurs permettent de préserver la balance ionique entre le cytosol et la mitochondrie ce qui est primordiale au bon fonctionnement de la cellule (Taegtmeyer et al., 1999).

I.4.6 L'ATP, sa formation et sa régulation

La synthèse d'ATP se produit principalement au niveau mitochondrial (~ 98%) où la phosphorylation oxydative permet le couplage entre la consommation d'oxygène et la phosphorylation de l'ADP (Sztark et al., 1999; Stanley et al., 2002). Cette synthèse nécessite un apport continu en oxygène obtenu grâce à la circulation coronarienne (Opie, 1998). En présence d'oxygène, la chaîne respiratoire mitochondriale oxyde les équivalents réduits, c'est-à-dire le NADH et le $FADH_2$ formés lors du métabolisme des divers substrats. Un gradient de protons est ainsi généré et utilisé par l'ATP synthase pour convertir l'ADP, formé principalement lors de la contraction musculaire, en ATP (Tableau V).

Tableau V. Réactions métaboliques impliquées dans la production d'énergie

| Classes | Substrats | Produits | Voie métabolique | Équiv. Réduits | | ATP/mole* |
|---|--------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|-------------------|-----------|
| | | | | NADH | FADH ₂ | |
| Glucides | Glucose | 2 Pyruvates | Glycolyse | 2 | | 2 |
| | Glycogène | 2 Pyruvates | Glycolyse | 2 | | 3 |
| | Lactate | 1 Pyruvate | Lactate déshydrogénase | 1 | | |
| | Pyruvate | Acétyl-CoA | Pyruvate déshydrogénase | 1 | | |
| Lipides | Palmitate | 8 Acétyl-CoA | β-oxydation | 7 | 7 | |
| Corps cétoniques | β-HB | Acétoacétate | β-HB déshydrogénase | 1 | | |
| | Acétoacétate | 2 Acétyl-CoA | 3-cétoacyl-CoA transférase/thiolase | | | |
| Glucides + Lipides + Corps cétoniques | Acétyl-CoA | CO ₂ + H ₂ O | CAC | 3 | 1 | 1 |

* Quantité d'ATP produite par des réactions de phosphorylation au niveau des substrats.

Chaque jour, le cœur humain doit synthétiser environ 35g d'ATP afin de fournir l'énergie permettant sa continue contraction (interaction actine-myosine), le maintien des gradients ioniques (Na⁺ et K⁺) ainsi que plusieurs autres fonctions vitales. En conditions physiologiques, environ 2/3 de l'ATP hydrolysé par le cœur est utilisé pour le travail contractile et le 1/3 restant, pour l'activité des pompes ioniques, soit principalement la Ca²⁺ ATPase du réticulum sarcoplasmique (*Stanley et al., 2002*). Une des tâches clé de la cellule est de coordonner la vitesse de production d'ATP à la vitesse de consommation d'ATP. Cette régulation s'avère complexe et n'est toujours pas entièrement expliquée, dû au fait que la production d'ATP se fait principalement au niveau de la mitochondrie et que son utilisation se produit au niveau du sarcomère (*Taegtmeyer, 2000b*).

Pour une même quantité de substrats oxydés, les acides gras permettent une plus grande production d'ATP (Tableau VI). Toutefois, l'oxydation des acides gras n'est pas aussi efficace que celle du glucose. En effet, si l'on tient compte de la consommation d'oxygène, les acides gras nécessitent 10% plus d'oxygène que les glucides pour produire une quantité équivalente d'ATP (*Lopaschuk, 2001a*). Ainsi,

les acides gras sont plus efficaces d'un point de vue énergétique et le glucose en terme d'oxygène consommé. Par ailleurs, seuls le glucose et le glycogène contribuent à la formation d'ATP dans le cytosol. Parmi toutes les réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme intermédiaire, celles où intervient directement l'oxygène sont très peu nombreuses. Ainsi, la présence des systèmes permettant l'utilisation d'oxygène comme accepteur final d'électrons augmente considérablement l'efficacité du processus de formation d'énergie cellulaire.

Tableau VI. Quantité d'ATP produite à partir d'une mole des principaux substrats exogènes utilisés par le cœur normoxique (Opie, 1998)

| Substrats | ATP produit par molécule | | ATP produit par atome de carbone | | ATP produit par atome d'oxygène consommé | |
|-----------|--------------------------|-------|----------------------------------|-----|--|------|
| | NC | C | NC | C | NC | C |
| Glucose | 38 | 32 | 6.3 | 5.2 | 3.17 | 2.58 |
| Lactate | 18 | 14.75 | 6.0 | 4.9 | 3.00 | 2.46 |
| Pyruvate | 15 | 12.25 | 5.0 | 4.1 | 3.00 | 2.50 |
| Palmitate | 130 | 105 | 8.1 | 6.7 | 2.83 | 2.33 |

NC (non corrigé) : Le calcul de gauche assure une oxydation complète des substrats, sachant que la chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative produisent respectivement 3 et 2 moles d'ATP par mole de NADH et de FADH₂ générée par le catabolisme des substrats énergétiques.

C (corrigé) : Le calcul de droite tient compte de la perte d'énergie au cours des réactions de la phosphorylation oxydative tel que calculé par Hinkle et ses collaborateurs (Hinkle *et al.*, 1991).

Quatre réactions, dont deux cytosoliques et deux mitochondriales, sont des sites de phosphorylation au niveau des substrats et permettent la formation d'une molécule d'ATP ou de GTP en absence d'oxygène (Tableau VII). Les deux réactions cytosoliques font partie de la voie glycolytique et sont reliées à la conversion du glucose ou du glycogène en pyruvate. L'importance de cette formation d'ATP cytosolique est non seulement critique dans toutes conditions où l'oxygène devient limitant, mais semble aussi essentiel au bon fonctionnement des diverses pompes ioniques dont l'activité est déterminante pour la contraction du cœur (Weiss *et al.*, 1985). Les deux réactions mitochondriales font partie du CAC et sont reliées à la production de succinate. Ainsi, le lactate et le succinate sont deux marqueurs du métabolisme anaérobie (Fréminet *et al.*, 1980c; Hochachka *et al.*, 1976; Taegtmeyer, 1978).

Tableau VII. Production d'énergie par les réactions de phosphorylation au niveau des substrats

| Sites cellulaires | Enzyme impliquée | Réactions |
|-------------------|---|---|
| Cytosol | Pyruvate kinase | PEP + ADP → Pyruvate + ATP |
| | Phosphoglycérate kinase | 1,3-Bisphosphoglycérate + ADP → 3-Phosphoglycérate + ATP |
| Mitochondrie | Succinate thiokinase (Succinyl-CoA synthétase) | Succinyl-CoA + GDP → Succinate + GTP |
| | Fumarate réductase | Fumarate + NADH + ADP → Succinate + NAD ⁺ + ATP |

PEP, phosphoénolpyruvate; GTP, guanosine triphosphate

I.5 La régulation réciproque et concertée de l'utilisation des glucides et des lipides.

Cette section présente d'abord la relation existant entre l'utilisation du glucose et des acides gras, laquelle est à la base du « cycle de Randle ». Par la suite, elle aborde plus spécifiquement les notions relatives au citrate et au malonyl-CoA, deux molécules au centre de la régulation concertée des glucides et des lipides.

I.5.1 Le cycle de Randle

Un mécanisme décrivant une régulation concertée entre le métabolisme glucidique et lipidique fut proposé pour la première fois en 1963 par Randle et ses collaborateurs (*Randle et al., 1963*). La théorie sous-jacente à ce mécanisme, connu sous l'appellation du « cycle de Randle » ou du « cycle glucose-acides gras », prédit qu'en présence d'une concentration élevée d'acides gras, l'augmentation de leur oxydation inhibe le métabolisme glucidique, c'est-à-dire la glycolyse et l'oxydation du glucose (*Randle, 1998*). Les principaux points de contrôle de ce cycle se situent au niveau de la PFK-1 dans le cytosol et de la PDH dans la mitochondrie (*Randle, 1998*). Plus précisément, l'oxydation des acides gras entraînerait l'inactivation de la PDH via leurs effets sur les rapports [acétyl-CoA]/[CoA] et [NADH]/[NAD⁺] (*Weiss et al., 1989; Lerch, 1993; Sugden et al., 2001*). De plus, suite à une augmentation de la concentration de citrate, causée par une production accélérée d'acétyl-CoA dérivé des acides gras, le citrate mitochondrial serait dirigé

vers le cytosol via le transporteur des acides tricarboxyliques de la membrane mitochondriale. Ce citrate cytosolique agirait en tant qu'inhibiteur du flux glycolytique au niveau de la PFK-1 (*Garland et al., 1963; Kauppinen et al., 1982*). Le glucose serait alors dirigé vers la formation de glycogène.

Grâce à cette régulation, les flux de substrats dans les diverses voies métaboliques s'ajustent en fonction de leurs disponibilités et des besoins énergétiques du cœur. En période de jeûne, les triglycérides du tissu adipeux sont hydrolysés et libèrent des acides gras, lesquels inhibent le métabolisme du glucose. Ainsi, le « cycle de Randle » repose sur l'effet cyclique de la lipolyse des tissus adipeux (*Randle et al., 1963*). De fait, les acides gras inhibent l'oxydation du glucose davantage que la glycolyse, et la glycolyse davantage que le transport du glucose à l'intérieur de la cellule (*Sambandam et al., 2002*).

Toutefois, une lacune au « cycle de Randle » tel que décrit initialement résidait dans l'incapacité d'expliquer le mécanisme par lequel le métabolisme des glucides inhibe celui des lipides. Ce n'est que plus tard, soit en 1978, que les travaux de l'équipe de McGarry (*McGarry et al., 1978*) ont permis de mettre en évidence une telle relation (Figure 8). Il fut proposé que la régulation des acides gras par les glucides se situe au niveau du malonyl-CoA et de la CPT-I. Pour la première fois, le malonyl-CoA fut suggéré comme un inhibiteur de la CPT-I (*McGarry et al., 1979*). Cette inhibition par le malonyl-CoA sera présentée plus en détails à la section 1.5.3. Depuis lors, ce mécanisme de régulation a fait l'objet de nombreuses études et s'avère bien documenté et accepté dans les tissus lipogéniques comme le foie et les tissus adipeux (*Saggerson et al., 1992*). Toutefois, l'étude de ce mécanisme dans les tissus non-lipogéniques comme le cœur est plus récente et n'est toujours pas entièrement définie et acceptée.

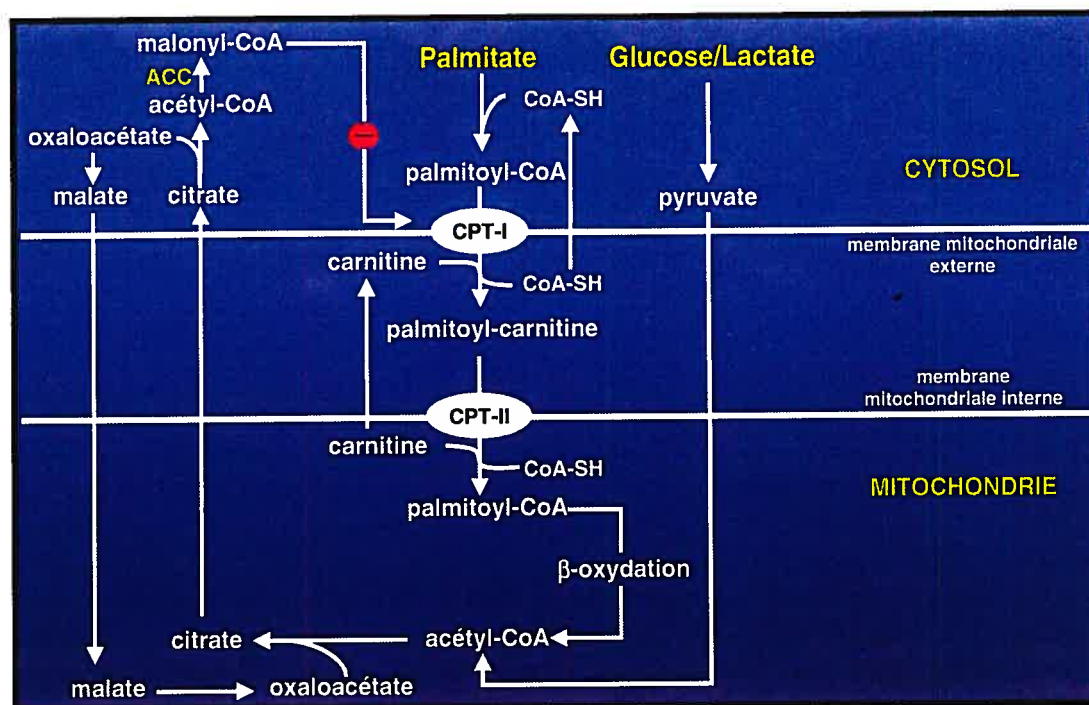


Figure 8. Représentation schématique de l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose et le lactate (adapté de Depré et al., 1999)

CPT-I et -II, carnitine palmitoyl transférase-I et -II

I.5.2 Le citrate : bien plus qu'un intermédiaire du cycle de Krebs

C'est en 1764, grâce à un chimiste suédois, que le citrate fut isolé pour la première fois. Le citrate est un chélateur d'ions métalliques. En effet, existant dans la plupart des cellules sous la forme d'un trianion, le citrate chélate les ions de Ca^{2+} , Fe^{2+} et Mg^{2+} plus efficacement que la plupart des autres anions organiques (Srere, 1992). Bien que le citrate soit davantage connu pour son rôle de premier intermédiaire du cycle de Krebs, il s'avère également un générateur d'acétyl-CoA extramitochondrial nécessaire aux voies biosynthétiques (acétylcholine, cholestérol), ainsi qu'un régulateur (activateur ou inhibiteur) d'enzymes liées au métabolisme glucidique et lipidique (PFK-1, GAPDH, CPT-I) (Nielsen, 1983). Il existe trois types de protéines interagissant avec le citrate : (i) les enzymes qui forment, clivent ou modifient le citrate, (ii) les protéines qui transportent le citrate au travers des biomembranes, et enfin (iii) les enzymes dont l'activité est modulée suite à leur liaison à la molécule de citrate (Srere, 1992).

Dans la première catégorie de protéines, on dénombre plusieurs enzymes dont la citrate synthase, l'aconitase et l'ACL, lesquelles sont toutes présentes dans la cellule cardiaque. La citrate synthase catalyse la première réaction du CAC, c'est-à-dire une condensation de Claisen entre une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'OAA, ce qui engendre l'hydrolyse du thioester et la formation d'une molécule de citrate, d'un coenzyme A et d'un proton. L'aconitase catalyse l'isomérisation du citrate en isocitrate (Srere, 1992), tandis que l'ACL cytosolique clive le citrate cytosolique et génère l'acétyl-CoA nécessaire, entre autres, aux procédés biosynthétiques (Srere, 1992).

Il est à noter que plusieurs analyses présentées dans cette thèse reposent sur l'utilisation de la citrate lyase. Cette enzyme, qui clive le citrate en acétate et OAA, n'est retrouvée que chez certains organismes anaérobiques ayant la capacité de croître en présence de citrate. L'utilisation de cette enzyme a permis de déterminer le patron de marquage de la portion OAA et acétyl du citrate et par conséquent, d'évaluer les flux métaboliques directement reliés à la synthèse du citrate (voir la section I.9 pour plus de détails).

Quant à la deuxième catégorie de protéines, il existe dans la membrane mitochondriale un transporteur des acides tricarboxyliques. Ce transporteur est un antiport citrate-malate. L'équipe de Chappell et Haaroff furent les premiers en 1967 à décrire ce transporteur et à démontrer que le citrate, le *cis*-aconitate, le *thréo*-D-isocitrate et le D- et L-tartrate sont parmi les substrats de ce transporteur (Chappell et al., 1967). La présence d'un transporteur des acides tricarboxyliques pour le transport du citrate à l'extérieure de la mitochondrie fut d'abord démontrée dans le foie (Chappell et al., 1969), puis dans les tissus adipeux (Schiller et al., 1974), les reins (Robinson et al., 1977) et le cerveau (Rafalowska, 1979). Dans les tissus lipogéniques, le clivage du citrate cytosolique fournit les unités acétyls nécessaires aux réactions biosynthétiques, telles que la synthèse d'acides gras et de cholestérol. Dans les tissus non-lipogéniques comme les cellules- β , le muscle squelettique et le cœur, la notion de citrate cytosolique est beaucoup plus récente et demeure un sujet de controverses étant donné la très faible activité du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques (Azzi et al., 1993). Toutefois, dans le cœur cette libération de citrate, de la mitochondrie au cytosol, fut à la fois observée lors d'expérience ex

vivo chez le rat et *in vivo* chez l'humain (Nielsen et al., 1980; Bagger et al., 1981; Thomassen et al., 1983; Comte et al., 1997a; Bagger et al., 2000). Ainsi, dans le cœur le concept selon lequel le citrate cytosolique serait non seulement une source d'acétyl-CoA nécessaire à certaines réactions biosynthétiques, mais aurait également un rôle de régulateur important sur le métabolisme glucidique et lipidique, demeure un sujet de recherche et de controverses. Parmi les inhibiteurs du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques on retrouve, entre autres, le *n*-éthyl citrate, le 1,2,3-benzène tricarboxylique acide (1,2,3-BTC), les composés sulfhydryles et le palmitoyl-CoA. Il est à noter qu'un transporteur de citrate se retrouve également au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes. Toutefois, peu d'études ont analysé cette protéine outre que dans les reins, au niveau des tubules et des bordures en brosse (Srere, 1992).

Enfin, la troisième catégorie de protéines comprend plusieurs enzymes retrouvées dans le cœur et dans d'autres tissus, et dont l'activité est affectée par la molécule de citrate tel que présenté dans le Tableau VIII. En résumé, le citrate exerce un effet inhibiteur sur trois enzymes du métabolisme cardiaque, c'est-à-dire la citrate synthase, la PFK-1 et la PDH, et un effet activateur sur l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Il convient de mentionner qu'en inhibant la PFK et en activant l'ACC, le citrate contribue à la régulation concertée du métabolisme glucidique et lipidique (Randle, 1998; Zammit, 1999).

Tableau VIII. Effet du citrate sur diverses enzymes du métabolisme cardiaque ainsi que sur d'autres tissus

| Enzyme | Fonction métabolique | Effet du citrate | L'animal et l'origine tissulaire de l'enzyme |
|-----------------------------|---|------------------|--|
| ACC* | Synthèse des acides gras Synthèse du malonyl-CoA | + | Rat : tissu adipeux Rat : cœur Poule : foie Rat : glandes mammaires |
| CS ^φ | CAC | - | Bœuf : cœur Souris : foie Rat : cœur |
| Fructose-1,6-biphosphatase* | Gluconéogenèse | + | Rat : muscle squelettique |
| PFK* | Glycolyse | - | Lapin : muscle squelettique Rat : cœur et muscle Brebis : cerveau Rat : foie Rat : tissu adipeux Rat : cortex rénal Humain : tissu adipeux Cochon : rate Rat : glandes mammaires Rat : thyroïde |
| PGM* | Glycogénolyse | - | Souris : muscle squelettique Rat : tissu adipeux |
| Complexe PDH ^φ | Décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA | - | Rat : foie Rat : cœur Rat : muscle squelettique Rat : tissu adipeux |

ACC, acétyl-CoA carboxylase; CAC, cycle de l'acide citrique; CS, citrate synthase; PFK, phosphofruktokinase; PGM, phosphoglucomutase; PDH, pyruvate déshydrogénase
* : enzyme cytosolique; ^φ : enzyme mitochondriale; + : activateur; - : inhibiteur

I.5.3 Le malonyl-CoA

Le malonyl-CoA est majoritairement retrouvé au niveau du cytosol, mais également en plus faible concentration dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Dans les cellules animales lipogéniques, le malonyl-CoA possède trois fonctions métaboliques. Tout d'abord, il fournit les carbones nécessaires à la synthèse de

novo du palmitate. Deuxièmement, il est requis pour l'élongation des acides gras au niveau du réticulum endoplasmique. Enfin, il régule l'oxydation des acides gras en inhibant la CPT-I (McGarry *et al.*, 1997). Dans les tissus non-lipogéniques, où la synthèse *de novo* d'acides gras est quasi inexistante, le rôle principal du malonyl-CoA est de réguler l'oxydation des acides gras. Ce rôle du malonyl-CoA dans les cellules- β et le muscle squelettique a fait l'objet de nombreux articles de revue (Prentki *et al.*, 1996, Ruderman *et al.*, 1999). Dans ces articles, il est proposé que le malonyl-CoA soit un signal moléculaire cytosolique reflétant l'abondance en glucose. Il aurait la propriété de réguler la répartition des substrats énergétiques métabolisés via l'inhibition de la CPT-I.

Dans la présente section, seront revues les connaissances actuelles sur les principales composantes du métabolisme du malonyl-CoA et sur son rôle dans l'inhibition de la CPT-I dans les cellules du cœur (Lopaschuk *et al.* 1994b, Awan *et al.*, 1993, Thampy, 1989). L'implication clinique d'une dysrégulation au niveau du métabolisme du malonyl-CoA sera ensuite brièvement discutée à la section I.7.3.

I.5.3.1 Les composantes du métabolisme du malonyl-CoA

Dans le cœur, le niveau de malonyl-CoA est sujet à de rapides fluctuations en fonction de la demande énergétique ainsi que des conditions nutritionnelles et hormonales (Dyck *et al.*, 1998; Goodwin *et al.*, 1999). D'ailleurs, la demi-vie du malonyl-CoA est estimée à environ 1.25 minutes (Reszko *et al.*, 2001). Les enzymes impliquées dans le métabolisme du malonyl-CoA sont l'ACC pour sa synthèse, et la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) pour sa dégradation (Hopkins *et al.*, 2003) (Tableau IX).

L'ACC est une enzyme cytosolique catalysant la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Elle fut longtemps considérée comme ayant une activité négligeable dans le cœur, vu l'absence de synthèse *de novo* des acides gras dans ce tissu. Selon certains auteurs (Wit-Peeters *et al.*, 1970), le malonyl-CoA retrouvé dans le cœur ne pouvait provenir que de l'action de la propionyl-CoA carboxylase mitochondriale. Ce n'est qu'une vingtaine d'années plus tard que l'équipe de Thampy identifia et purifia l'ACC à partir d'un homogénat de cœur de rat (Thampy, 1989).

On retrouve dans le cœur deux isoformes de l'ACC, une isoforme prédominante de 280 kDa, l'ACC $_{\beta}$, et une seconde isoforme de 265 kDa, l'ACC $_{\alpha}$ (Dyck et al., 2002). Contrairement au tissu cardiaque, dans les tissus lipogéniques où la synthèse *de novo* d'acides gras est importante, c'est l'isoforme de 265 kDa qui prédomine. L'ACC utilise spécifiquement l'acétyl-CoA comme substrat. Il est à noter que la propionyl-CoA carboxylase utilise également l'acétyl-CoA comme substrat, mais avec une affinité cent fois moindre que pour son substrat naturel, le propionyl-CoA (Wang et al., 1996). Néanmoins, vu la grande activité de la propionyl-CoA carboxylase dans les mitochondries des cellules cardiaques, la possibilité que le malonyl-CoA puisse être formé dans ce compartiment existe. En fait, une étude récente a démontré que l'ACC $_{\beta}$ se retrouve également dans les mitochondries des cellules cardiaques (Abu-Elheiga et al., 2000), il s'agit toutefois d'un sujet controversé.

Contrairement au foie, dans les tissus non-lipogéniques l'activité de l'ACC $_{\beta}$ varie peu en réponse au jeûne ou à l'état nourri, et ce malgré des changements observés au niveau de la concentration en malonyl-CoA (Ruderman et al., 1999). L'activité de l'ACC $_{\beta}$ est pourtant sujette à une régulation impliquant un processus de phosphorylation/déphosphorylation régie par la 5'-AMP Kinase (AMPK) (Dyck et al., 2000). Spécifiquement, l'activité de l'ACC $_{\beta}$ est inhibée suite à sa phosphorylation par l'AMPK et activée suite à sa déphosphorylation (Kudo et al., 1995; Stanley et al., 1997a; Dyck et al., 2002). Une faible augmentation de l'AMP cytosolique suffit à activer l'AMPK (Kudo et al., 1995). Ainsi, via l'AMPK, l'activité de l'ACC $_{\beta}$ et parallèlement les niveaux tissulaires de malonyl-CoA varient en fonction de l'état énergétique de la cellule. Par exemple, lors d'une augmentation du travail cardiaque l'activité de l'ACC $_{\beta}$, et par conséquent la concentration de malonyl-CoA, sont diminuées, permettant ainsi de relâcher l'inhibition de la CPT-I et d'augmenter l'entrée des acides gras et leur β -oxydation dans la mitochondrie pour la production d'énergie (Ruderman et al., 1999). Il existe d'autres effecteurs positifs et négatifs de l'ACC $_{\beta}$. En effet, elle est activée allostériquement par le glucose, l'insuline et le citrate (Saddik et al., 1993), et inhibée par les acyl-CoA à chaîne longue et le malonyl-CoA, tel que présenté au Tableau IX (Moule et al., 1992; Kudo et al., 1995; Zammit, 1999). De plus, l'équipe de Saha a démontré que certains modulateurs

négatifs de l'ACC β , tels que l'AMPK et les acyl-CoA à chaîne longue, empêchent l'activation de l'ACC β par le citrate (Saha *et al.*, 1999; Zammit, 1999). Toutefois, il est à noter que l'activité de l'ACC β est principalement régulée par la concentration de son substrat cytosolique, l'acétyl-CoA, du fait que le niveau d'acétyl-CoA est plus faible que le K_m de l'enzyme pour son substrat (117 μ M). En résumé, l'activité de l'ACC peut être modulée de façon réversible par phosphorylation de même que par l'effet de divers effecteurs allostériques.

Tableau IX. Principaux intervenants reliés au métabolisme du malonyl-CoA et à sa régulation

| Enzymes/Métabolites | Rôles | Modulateurs |
|--|-------------|--|
| ACC | Synthèse | Positifs : glucose, insuline, citrate Négatifs : malonyl-CoA, acyl-CoA à chaîne longue, 5'-AMPK |
| Citrate cytosolique Acétylcarnitine | Précurseurs | Positif : abondance en substrats mitochondriaux |
| CPT-I | Cible | Négatif : Malonyl-CoA |
| MCD | Dégradation | Positif : 5'-AMPK Négatif : PPAR α |

ACC, Acétyl-CoA carboxylase; MCD, Malonyl-CoA décarboxylase; PPAR α , « Peroxisome proliferator-activated receptor α »;

Bien que l'ACC β et sa régulation aient fait l'objet de nombreuses études, une baisse de la synthèse du malonyl-CoA ne peut expliquer qu'en partie les changements rapides des niveaux tissulaires de malonyl-CoA (Lopaschuk *et al.*, 1994b). Ceci suggère l'importance de d'autres voies possibles d'utilisation ou de dégradation du malonyl-CoA dans le cœur. Au niveau des mitochondries, la MCD aurait pour rôle d'éviter l'accumulation du malonyl-CoA formé par la propionyl-CoA carboxylase afin de protéger les enzymes mitochondriales d'une possible inhibition par le malonyl-CoA (Scholte, 1969; Sacksteder *et al.* 1999; Voilley *et al.*, 1999). La MCD fut longtemps perçue comme une enzyme uniquement mitochondriale. Toutefois, en 1998 et 1999, l'équipe de Dyck, de même que l'équipe de Sacksteder, identifièrent respectivement une isoforme de la MCD dans des extraits cytosoliques et peroxisomales (Dyck *et al.*, 1998; Sacksteder *et al.*, 1999). De plus, l'étude de la

protéine a révélé la présence de séquences ciblant l'enzyme non seulement vers les mitochondries mais également vers les peroxysomes (Voilley et al., 1999). La MCD peroxysomales aurait pour fonction d'éliminer le malonyl-CoA résultant de l'oxydation des acides gras dicarboxyliques (Sacksteder et al., 1999). D'autre part, le séquençage de cette enzyme démontre la présence de plusieurs sites de phosphorylation (Voilley et al., 1999). La MCD cytosolique serait en effet régulée par l'AMPK (Hopkins et al., 2003).

En utilisant un modèle de cœurs de rats perfusés *ex vivo*, plusieurs auteurs ont démontré qu'une diminution de l'activité de l'ACC_β est associée au maintien ou à l'augmentation de l'activité de la MCD. Ces changements sont compatibles avec un rôle complémentaire de ces deux enzymes dans le maintien des concentrations tissulaires de malonyl-CoA. Ainsi, la MCD, tout comme l'ACC_β, joue un rôle important dans la régulation de l'oxydation des acides gras. Il a été démontré qu'une déficience en MCD peut engendrer l'inhibition de l'oxydation des acides gras, ce qui pourrait être à l'origine de certaines cardiomyopathies (Yano et al., 1997; Dyck et al., 2002). Ainsi, une dysrégulation concernant le métabolisme du malonyl-CoA pourrait être impliquée dans la résistance à l'insuline (Ruderman et al., 1999), l'apoptose (Hickson-Bick et al., 2000) ainsi que la récupération fonctionnelle du cœur suite à un épisode ischémique (Kantor et al., 1999).

1.5.3.2 Les précurseurs de l'acétyl-CoA cytosolique

Il existe à l'heure actuelle une controverse dans la littérature concernant le ou les précurseurs de l'acétyl-CoA cytosolique nécessaire à la synthèse du malonyl-CoA, tel que démontré à la Figure 9. Certains auteurs proposent le citrate cytosolique (Poirier et al., 2002) alors que d'autres proposent l'acétyl-carnitine (Lysiak et al., 1986; Lopaschuk et al., 1994b; Abdel-aleem et al., 1996).

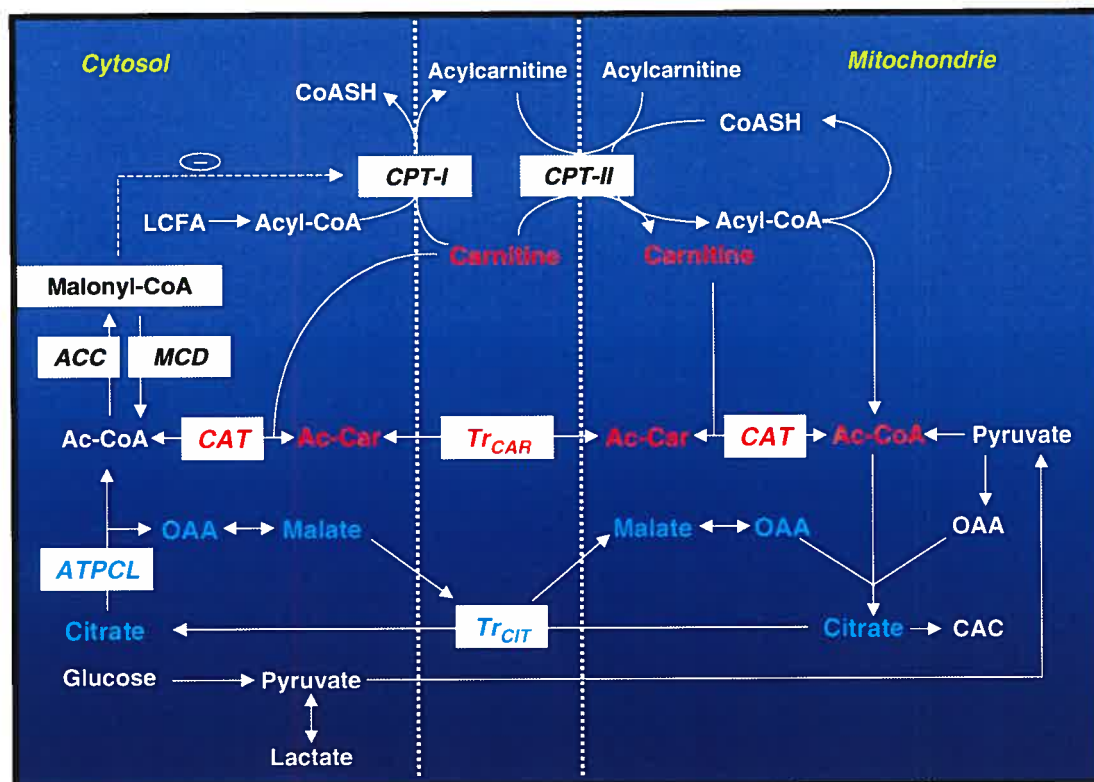


Figure 9. Représentation schématique des mécanismes possiblement responsables du transfert des unités acétyls mitochondriales jusqu'au site cytosolique de synthèse du malonyl-CoA dans le muscle cardiaque (adapté de Poirier et al., 2002)

Mécanisme impliquant le citrate cytosolique représenté en bleu.

Mécanisme impliquant l'acétyl-carnitine cytosolique représenté en rouge.

ACC, acétyl-CoA carboxylase; AcCar, acétylcarnitine; Ac-CoA, acétyl-CoA; ATPCL, ATP-citrate lyase; CAT, carnitine acétyltransférase; CPT-I et -II, carnitine palmitoyl transférase-I et -II; CAC, cycle de l'acide citrique; LCFA, acide gras à chaîne longue; MCD, malonyl-CoA décarboxylase; OAA, oxaloacétate; Tr_{car} , carnitine-acylcarnitine translocase; Tr_{cit} , transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques.

Tel que mentionné, le rôle du citrate cytosolique dans la régulation de l'oxydation des substrats est reconnu depuis longtemps dans les tissus lipogéniques. Le citrate inhibe l'utilisation du glucose via son effet allostérique sur l'activité de la PFK-1 (Garland et al., 1963), et l'oxydation des lipides via son métabolisme en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est formé à partir de l'acétyl-CoA lequel provient du clivage du citrate par l'ACL. Toutefois, dans ces tissus, le citrate cytosolique est également un intermédiaire dans le transfert des unités acétyls nécessaires à la synthèse *de novo* des lipides. Les organes non-lipogéniques, quant à eux, possèdent une plus

faible activité de l'ACL (0,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ poids humide dans le cœur; *Awan et al., 1993*), quoique suffisante pour la production extra-mitochondriale de malonyl-CoA.

Il a été proposé, lors d'études réalisées dans des tissus non-lipogéniques, que le citrate cytosolique ait un rôle de « signal moléculaire » (*Prentki et al., 1996, Ruderman et al., 1999*) (Figure 10). Des évidences expérimentales supportent ce concept dans les cellules- β (*Prentki et al., 1996*) et le muscle squelettique, chez le rat et chez l'humain (*Saha et al., 1999; Ruderman et al., 1999*). Ces études présentent une corrélation positive entre les concentrations de citrate et de malate tissulaires et celles de malonyl-CoA sous certaines conditions, soient lors d'une hyperinsulinémie et/ou d'une hyperglycémie ou lors d'inactivité physique. Cependant, cette corrélation n'est pas observée suite à une période de jeûne suivie d'un retour à l'état nourri, ainsi qu'en période d'exercice. En fait, dans toutes ces conditions analysées, l'activité de l' ACC_β est demeurée constante. Ces observations laissent entrevoir l'existence d'une fine régulation entre le citrate cytosolique et le malonyl-CoA.

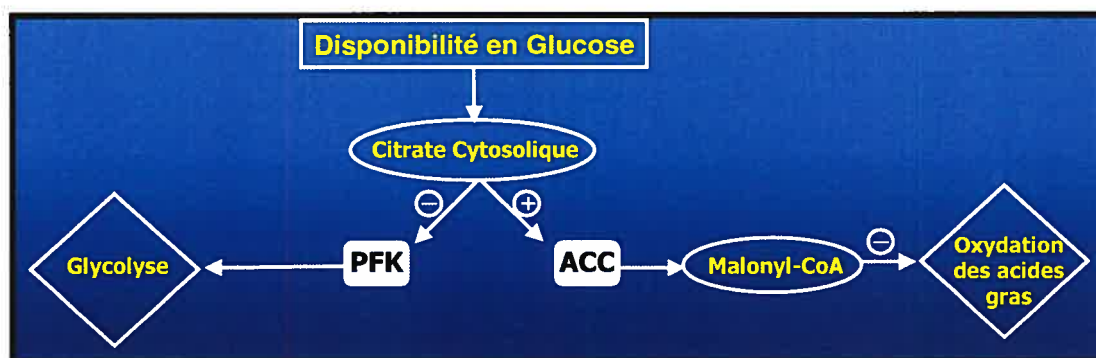


Figure 10. Le citrate cytosolique : molécule centrale dans la régulation du glucose et des acides gras dans le muscle squelettique (adapté de *Ruderman et al., 1999*).

PFK, phosphofructokinase; ACC, acétyl-CoA carboxylase

Jusqu'à tout récemment l'efflux de citrate, de la mitochondrie vers le cytosol, ou « cataplérose du citrate », était un processus remis en question dans le muscle cardiaque vue la faible activité du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques (*Cheema-Dhadli et al., 1976, Sluse et al., 1971*). Pourtant, l'effet inhibiteur du citrate sur l'activité *in vitro* de la PFK isolée de cœur de rat fut démontré

par l'équipe de Garland dans les années 60 (Garland et al., 1963). De plus, en 1997, les travaux de Comte et ses collaborateurs, réalisés dans le laboratoire du Dr Des Rosiers, ont démontré la présence d'un efflux de citrate dans un cœur intact, lequel est compatible avec l'activité du transporteur de citrate mitochondrial (Comte et al., 1997a).

La seconde voie potentielle de formation d'acétyl-CoA cytosolique implique l'acétylcarnitine (Lopaschuk et al., 1994b; Abdel-aleem et al., 1996; Longnus et al., 2001). Selon cette hypothèse, l'augmentation des niveaux d'acétyl-CoA mitochondrial, via l'activité de la PDH, active la carnitine acétyltransférase permettant le transfert du groupement acétyl, de l'acétyl-CoA à l'acétylcarnitine. Par la suite, l'acétylcarnitine est transférée dans le cytosol via la carnitine-acylcarnitine translocase, générant ainsi l'acétyl-CoA cytosolique qui pourrait être le substrat de l'ACC_β nécessaire à la formation de malonyl-CoA (Lopaschuk et al., 1994b).

1.5.3.3 Le malonyl-CoA, un inhibiteur de la CPT-I

Tel que mentionné, la CPT fait partie d'un complexe enzymatique composé de la CPT-I/carnitine/CPT-II (Figure 5). Les tissus extra-hépatiques, tels que le cœur et les muscles squelettiques, possèdent une haute activité mitochondriale de la CPT-I (Power et al., 1997). En fait, la CPT-I, plus spécifiquement l'isoforme musculaire (M-CPT-I : 90-98%) exerce un contrôle sur la vitesse de la β -oxydation des acides gras (Brown et al., 1995). Cette enzyme est régulée directement par le malonyl-CoA ($K_i = 50$ nM) et indirectement par l'activité de deux enzymes cytosoliques, l'AMPK et l'ACC_β (Cook, 1984; Kantor et al., 1999).

Dans le cœur et les muscles squelettiques, la M-CPT-I est beaucoup plus sensible (de 10 à 100 fois) au malonyl-CoA que dans le foie (isoforme hépatique : L-CPT-I) (Zammit, 1999). La comparaison entre le IC₅₀ de la CPT-I et la concentration intracellulaire de malonyl-CoA dans le cœur (10-15 nmol/g poids sec, ca. 3-9 μ M), laquelle est beaucoup plus élevée que le IC₅₀, pose un questionnement concernant la régulation de la CPT-I cardiaque par le malonyl-CoA dans une situation physiologique (Awan et al., 1993; Goodwin et al., 1999; Kantor et al., 1999; Lopaschuk et al., 1994a; Stanley et al., 1996). En effet, pour que le malonyl-CoA

puisse conférer un contrôle raffiné entre l'oxydation du glucose et des acides gras, l'inhibition de la CPT-I ne devrait pas être totale en tout temps. C'est dans cette optique qu'Awan et Saggerson ont proposé que le malonyl-CoA pouvait être lié à une enzyme du système d'élongation des acides gras, réduisant ainsi la quantité de malonyl-CoA libre disponible pour l'inhibition de la CPT-I (*Awan et al., 1993*). Une autre explication, présentée quelques années plus tard par l'équipe de Ruderman (*Ruderman et al., 1999*), propose une compartimentation intracellulaire du malonyl-CoA. Ainsi, les hypothèses proposées suggèrent soit une compartimentation intracellulaire du malonyl-CoA ou alors la possibilité qu'il puisse être lié à une protéine impliquée dans le système d'élongation des acides gras (*Abu-Elheiga et al., 2000; Dyck et al., 1998; Eaton et al., 2001; Hamilton et al., 2000; McGarry et al., 1997*). Toutefois, d'autres investigations sont encore nécessaires afin d'infirmer ou de confirmer ces hypothèses.

1.6 Lorsque métabolique et génomique se rencontrent

Bien que les questionnements dont traite cette thèse concernent principalement le métabolisme cardiaque, cette section fait une brève intrusion dans le monde de la génétique, puisque de plus en plus le métabolisme et la génétique se côtoient. Il est à noter que la notion de régulation génique du métabolisme cardiaque n'est apparue qu'à la fin des années 90, c'est pourquoi les connaissances sur ce sujet sont plus restreintes bien qu'elles évoluent très rapidement.

Tel que mentionné, il existe des mécanismes de régulation du métabolisme cardiaque à court terme et à long terme. Une régulation ou une adaptation à court terme est considérée comme immédiate car elle implique des réactions dont les mécanismes sont déjà en place dans l'organe, c'est-à-dire une modulation post-traductionnelle de l'activité d'enzymes régulatrices (*Taegtmeyer, 2000a*). À l'opposé, les mécanismes de régulation ou d'adaptation à long terme impliquent des réactions nécessitant la transcription de divers gènes. De ce fait, ce mécanisme de régulation permet une adaptation à plus long terme (*Taegtmeyer, 2000a; Taegtmeyer et al., 2002*).

Vers la fin du 19^e siècle, Oscar Langendorff découvre et propose une trilogie à savoir que la fonction contractile, le débit coronarien et le métabolisme oxydatif sont

intimement reliés et indissociable. Aujourd'hui, à l'aube du 21^e siècle, une seconde trilogie est proposée mettant en relation l'activité métabolique, l'expression génique et la fonction contractile du muscle cardiaque. Cette nouvelle trilogie, définie comme « la génétique de l'énergétique », met en relation l'ADN du noyau et l'ATP de la mitochondrie et du cytosol (Taegtmeyer, 2000a). Les fondements de cette récente trilogie reposent sur diverses interactions telles que présentées à la Figure 11. D'une part, il est proposé qu'une modification de l'expression génique de certaines protéines altère le transfert de l'énergie dans le métabolisme énergétique et par le fait même la fonction contractile du muscle cardiaque. D'autre part, certains intermédiaires du métabolisme énergétique pourraient induire la translocation au noyau de certains facteurs de transcription et/ou réguler la transcription de gènes codant pour des enzymes du métabolisme cardiaque. Finalement, une altération de la fonction contractile entraîne des changements dans le métabolisme énergétique et l'expression génique. Ainsi, l'ancienne croyance selon laquelle le cœur adulte possède un bagage génétique fixe et non modifiable est de ce fait révolue (Razeghi et al., 2001a).

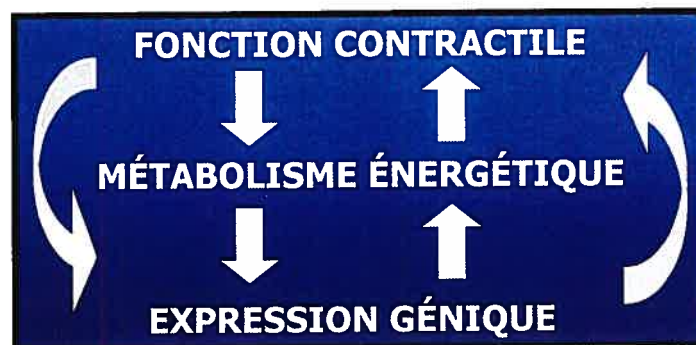


Figure 11. La génétique de l'énergétique (adapté de Taegtmeyer, 2000a)

L'utilisation préférentielle des lipides ou des glucides comme substrats énergétiques est en partie contrôlée à long terme par le niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans l'utilisation de ces substrats. Par exemple, la capacité à produire de l'énergie via l'utilisation des lipides est en partie contrôlée par le niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la β -oxydation mitochondriale. Selon la littérature récente, il apparaît que le principal régulateur de la transcription de ces enzymes soit le PPAR α . Ce contrôle de

l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique cardiaque par le PPAR α est activé, entre autres, au cours du développement post-natal, d'un jeûne de courte durée ou d'un entraînement physique. Le PPAR α fait partie de la superfamille des facteurs de transcription nucléaires parmi lesquels on retrouve également le PPAR β et le PPAR γ (PPAR γ_1 et PPAR γ_2) (Barger *et al.*, 2000). Les PPARs influencent le métabolisme lipidique, l'homéostasie glucidique, la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire, de même que l'athérosclérose (Elangbam *et al.*, 2001; van Bilsen *et al.*, 2002). Ils agissent en se liant à une séquence spécifique de l'ADN dans le promoteur du gène ciblé, appelée le « Peroxisome Proliferator Response Element » (PPRE). La liaison à l'ADN s'effectue sous forme d'un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis (RXR).

Le PPAR α est principalement retrouvé dans le cœur, le foie, le tissu adipeux brun, les reins et le duodénum. On le retrouve également, mais en quantité plus restreinte, dans le muscle squelettique, le thymus et les testicules (Kelly, 2002; Fruchart *et al.*, 2001). Il joue un rôle critique dans le contrôle du métabolisme des lipoprotéines ainsi que dans la captation et l'oxydation des acides gras (Elangbam *et al.*, 2001; Finck *et al.*, 2002). Ainsi, parmi les ligands du facteur de transcription PPAR α on retrouve principalement les AGCL, et ce de façon plus particulière dans le muscle cardiaque où la demande en énergie est très importante (Kelly, 2002). Une augmentation de la captation d'AGCL par les cardiomyocytes induit une réponse transcriptionnelle résultant en une hausse de l'expression des enzymes de la β -oxydation. Tel que présenté à la Figure 12, le PPAR α régule l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans chacune des étapes d'utilisation des AGCL par la cellule, incluant leur importation, leur thioestérification et leur β -oxydation mitochondriale. Parmi ces gènes on retrouve, entre autres, le transporteur des acides gras (FAT/CD36), la protéine de liaison aux acides gras (FABP), la MCD, la M-CPT-I, de même que l'acyl-CoA déshydrogénase des chaînes moyennes (MCAD) et celle des chaînes longues (LCAD) (Young *et al.*, 2001; Barger *et al.*, 2000). Le gène codant pour la MCAD fut la première cible du PPAR α cardiaque à être identifiée (Gulick *et al.*, 1994). Le PPAR α influence également le métabolisme lipidique en agissant sur l'homéostasie glucidique et ce, en modulant l'expression de la PDK4, l'enzyme inhibant l'oxydation du glucose par phosphorylation du complexe de la PDH. Ainsi,

le PPAR α semble réguler à un niveau transcriptionnel le choix des substrats énergétiques préférés (Razeghi et al., 2001b).

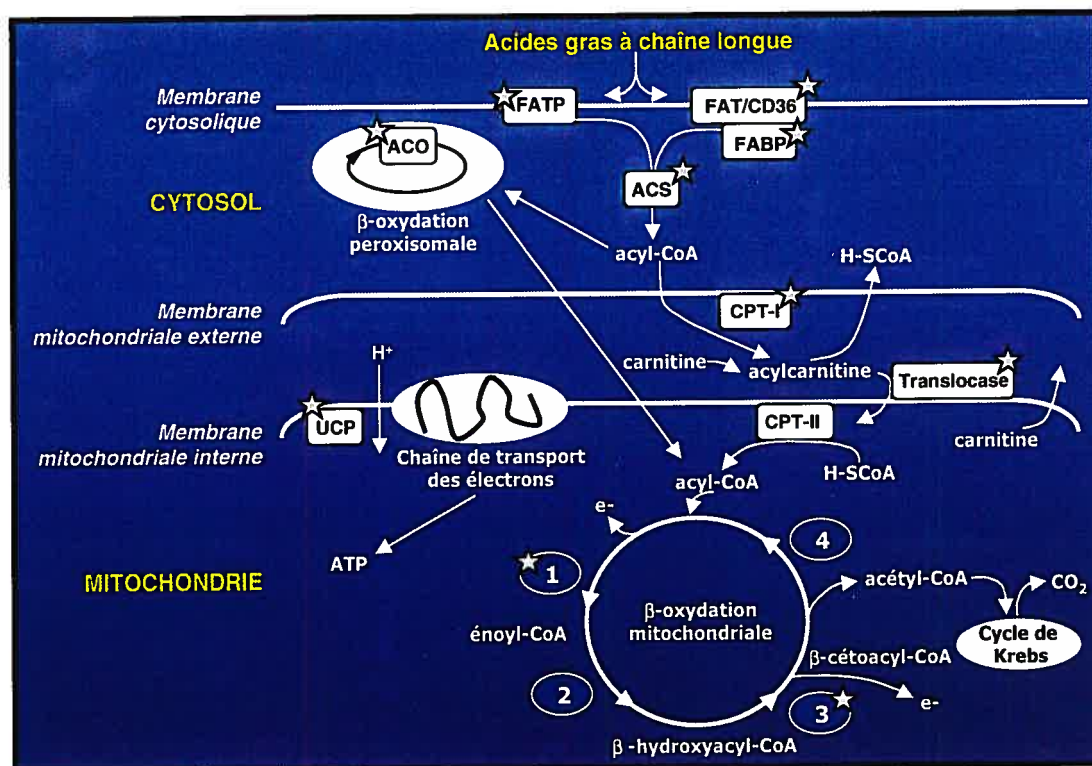


Figure 12. Cibles du PPAR α au niveau de l'importation, de la thioestérification et la β -oxydation des acides gras (adapté de Finck et al., 2002)

Les transporteurs et les enzymes régulés par les PPARs sont identifiés par une étoile. FATP, « fatty acid transport protein »; FAT/CD36, « fatty acid translocase/CD36 »; FABP, « fatty acid binding protein »; ACS, « acyl-CoA synthetase »; CPT-I et CPT-II, « carnitine palmitoyltransferase I et II »; ACO, « acyl-CoA oxidase »; UCP, « uncoupling proteins 2 and 3 »; ① Première enzyme de la β -oxydation : acyl-CoA déshydrogénase; ② Deuxième enzyme de la β -oxydation : énoyl-CoA hydratase; ③ Troisième enzyme de la β -oxydation : β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; ④ Quatrième enzyme de la β -oxydation : β -cétolase.

Plusieurs études réalisées chez des souris transgéniques dont le gène PPAR α est muté (PPAR α (-/-)), démontrent son importance dans le cœur pour le maintien du système d'oxydation mitochondriale (Barger et al., 2000; Campbell et al., 2002). De fait, ces souris présentent une baisse de l'oxydation mitochondriale du palmitate et conjointement, une hausse significative de la vitesse d'oxydation du glucose et de la glycolyse (Campbell et al., 2002). Ces souris sont incapables de maintenir une homéostasie lipidique et énergétique. À l'inverse, des souris transgéniques surexprimant le gène PPAR α démontrent une répression de la captation et de

l'utilisation du glucose (*Finck et al., 2002*). La diminution de l'oxydation des lipides chez les souris PPAR α (-/-) est associée à une hausse des niveaux de malonyl-CoA cardiaque. Il a récemment été démontré que l'activité de la MCD de même que les niveaux d'ARNm et de protéines sont significativement réduites dans les cœurs de souris PPAR α (-/-) (*Campbell et al., 2002; Dyck et al., 2002*). Cependant, aucun impact sur l'expression et l'activité de l'ACC et de l'AMPK n'est observé.

Par ailleurs, dans un contexte de pathologie cardiaque, plusieurs questions restent en suspend. Qu'en est-il de la régulation par les PPARs? Est-ce que le rôle des PPAR α en tant que régulateurs du métabolisme énergétique cardiaque est en quelque relation avec l'hypertrophie cardiaque? Bien que ces questions restent à être clarifiées et qu'aucun mécanisme ne confirme cette relation, plusieurs évidences permettent d'impliquer les PPAR α dans la pathologie de l'hypertrophie cardiaque. De ce fait, la section suivante fait état des principales notions concernant la régulation du métabolisme cardiaque dans un contexte de pathologie.

1.7 Le métabolisme des substrats dans la pathologie

L'adaptation du métabolisme cardiaque suite à un épisode ischémique ou en réponse à de l'hypertrophie progressive s'effectue selon des mécanismes distincts. L'épisode ischémique stimule des réactions de façon instantanée. En effet, tel qu'introduit à la section précédente, l'adaptation face à un épisode ischémique est immédiate et elle implique une modulation post-traductionnelle de l'activité d'enzymes régulatrices, soit par des effecteurs allostériques, via une modification covalente ou simplement par une translocation de l'enzyme. Par ailleurs, l'hypertrophie progressive implique des mécanismes d'adaptation à long terme nécessitant l'induction de l'expression de divers gènes (*Taegtmeyer, 2000a; Taegtmeyer et al., 2002*).

1.7.1 Les conséquences métaboliques de la privation d'oxygène : des changements aigus

Lors de l'ischémie, le métabolisme oxydatif est inhibé dans une proportion qui dépend de l'apport résiduel en oxygène. Ceci inclut l'activité de la chaîne de transport des électrons, mais également celle du CAC, de la réaction de la PDH impliquée dans l'oxydation des glucides, et des réactions impliquées dans la β -oxydation des acides

gras. Malgré l'existence de processus de production d'énergie en anaérobie, ceux-ci ne subviennent aux besoins énergétiques du cœur que pour un temps limité. De façon générale, une carence en oxygène entraîne un renversement allant d'un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie, ayant pour conséquence une accumulation de divers produits métaboliques. Ainsi, dans un cœur ischémié, le métabolisme du glucose en lactate devient la principale source de production d'énergie. Ce changement rapide d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie implique une stimulation de la captation de glucose, de la glycogénolyse, du flux glycolytique et de l'hydrolyse de l'ATP. Chaque molécule de glucose métabolisée en lactate entraîne la production de deux ions hydrogène (*Lopaschuk et al., 1993*). Par conséquent, une période de privation d'oxygène de plus de quelques minutes entraîne une hausse de la quantité de protons et une baisse des concentrations tissulaires des composés à haute teneur en énergie, tels l'ATP et la créatine phosphate. Des études ont rapporté que la concentration de créatine phosphate chute de 72% après 1 à 3 minute(s) d'ischémie alors que celle de l'ATP diminue de 65% après 15 minutes et de plus de 90% après 40 minutes (*Jennings et al., 1978; Jennings et al., 1981*). Cette baisse des niveaux d'ATP et de créatine phosphate est associée à une accumulation de NADH, de phosphate inorganique, de lactate et de protons. Sachant que l'acidose métabolique est impliquée dans la dysfonction contractile du cœur, certains auteurs proposent que cet excès de production d'ions H^+ puisse contribuer à la défaillance cardiaque (*Lopaschuk et al., 2002a*).

En outre, l'inhibition de l'oxydation des acides gras résulte en une accumulation dans le cytosol de leurs dérivés activés, les esters d'acyl-CoA (*Whitmer et al., 1978*), et ce, malgré une augmentation probable de la conversion de ces acyl-CoA en triglycérides favorisée par une formation accrue de glycérol-3-phosphate par la voie glycolytique (*Bilheimer et al., 1978; Schoonderwoerd et al., 1989; Whitmer et al., 1978*). L'accumulation des acyl-CoA n'est pas sans conséquence (*Zammit, 1999*). En effet, ils jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme intermédiaire et de l'expression génique (*Faergeman et al., 1997*). Par exemple, les acyl-CoA inhibent les translocases des nucléotides adényliques de la membrane mitochondriale interne (*Corr et al., 1984*), lesquelles permettent l'échange d'ATP et d'ADP entre les compartiments cytosoliques et mitochondriaux. Ils peuvent aussi contribuer à la

synthèse des céramides, et par le fait même induire des mécanismes d'apoptose (Zammit, 1999). De plus, ils activent la protéine kinase C (PKC) et engendrent l'ouverture des canaux K_{ATP} , de même que des pores de transition mitochondriaux (Zammit, 1999; Nichols et al., 2001; Liu et al., 2001).

Ainsi, les acyl-CoA influencent le métabolisme énergétique, de même qu'un nombre important de systèmes cellulaires, incluant les canaux et les pompes ioniques, les translocateurs d'enzymes et la fusion des membranes. En effet, les esters d'acyl-CoA à longue chaîne vont potentiellement entraîner de l'arythmie de par leurs effets dénaturants sur les membranes (Hendrickson et al., 1997). Toutefois, l'importance de la contribution des dérivés lipidiques aux dommages ischémiques demeure un sujet d'étude.

1.7.2 Les conséquences métaboliques de l'hypertrophie myocardique : des changements chroniques

Selon les évidences de la littérature, le métabolisme des substrats énergétiques dans le cœur adulte hypertrophique se caractérise par un retour au phénotype foetal, c'est-à-dire une augmentation de l'utilisation des glucides pour la production d'énergie aux dépens des acides gras (Taegtmeyer et al., 2002b; Sambandam et al., 2002). D'une part, le groupe de Taegtmeyer a rapporté en 1988 une augmentation de l'activité et de l'expression des enzymes de la voie glycolytique dans le myocarde hypertrophié (Taegtmeyer et al., 1988). Toutefois, il existe encore à ce jour une controverse à savoir si la hausse de l'activité glycolytique est accompagnée ou non de changements dans le taux d'oxydation mitochondriale du pyruvate. Selon Allard et ses collaborateurs, il y aurait une diminution de la vitesse d'oxydation du glucose. Une plus grande quantité de pyruvate issue de la glycolyse serait convertie en lactate plutôt qu'oxydée dans la mitochondrie (Allard et al., 1994). Cette conclusion semble être supportée par l'étude de Seymour et ses collaborateurs qui rapporte une diminution du ratio PDHa/PDHt (a; active, t; total) dans un modèle d'hypertrophie cardiaque modérée obtenu suite à une constriction de l'aorte abdominale. Cette baisse dans la proportion de PDH sous sa forme active pourrait s'expliquer par un changement dans l'activité et la quantité de PDH phosphatase et de PDH kinase (Seymour et al., 1997). En outre, Montessuit et ses collaborateurs ont démontré une augmentation de l'expression de l'ARNm du transporteur de

glucose GLUT1 dans des cardiomyocytes hypertrophiés (*Montessuit et al., 1999*). Dans une publication récente, le groupe de Taegtmeyer explique le renversement métabolique des cœurs hypertrophiques comme étant la conséquence d'une régulation à la baisse du niveau transcriptionnel de trois enzymes ayant un rôle clé dans la régulation de l'oxydation mitochondriale des substrats : la PDK4, laquelle phosphoryle et inactive le complexe de la PDH, la MCD, laquelle régule le niveau de malonyl-CoA et par le fait même la vitesse de β -oxydation des acides gras, et la protéine découplante 3, laquelle découple la phosphorylation oxydative de l'ADP (*Taegtmeyer et al., 2002b*).

D'autre part, plusieurs études réalisées sur divers modèles animaux d'hypertension et d'hypertrophie cardiaque, principalement par le groupe de Kelly à la fin des années 90, rapportent une baisse de l'expression des enzymes de la β -oxydation, soit la MCAD (l'acyl-CoA déshydrogénase des chaînes moyennes), la LCAD (l'acyl-CoA déshydrogénase des chaînes longues), et la LCHAD (β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase des chaînes longues) lorsque la maladie progresse de l'hypertrophie à la dysfonction ventriculaire (*Barger et al., 1999; Kelly, 2002*). Des changements similaires seraient également observés chez l'humain comme en témoignent certaines études réalisées sur des échantillons provenant de sujets souffrant de cardiomyopathies. Ces études démontrent que les niveaux d'ARNm codant pour la MCAD et la LCHAD sont régulés à la baisse lors de la progression de l'hypertrophie cardiaque vers la dysfonction ventriculaire (*Sack et al., 1996; Barger et al., 1999*).

Tous les changements métaboliques du cœur hypertrophique mentionnés ci-haut semblent s'expliquer par une désactivation de la signalisation par les PPAR α (*Taegtmeyer et al., 2002b; Barger et al., 1999; Barger et al., 2000a; Barger et al., 2000b; Young et al., 2001; Jamshidi et al., 2002; Lehman et al., 2002*). Tel que décrit à la section 1.6, les PPAR α jouent un rôle critique dans l'homéostasie du métabolisme cardiaque. D'ailleurs, une étude récente de Jamshidi et ses collaborateurs suggère un lien potentiel entre le gène codant pour le PPAR α et l'importance de l'HVG chez l'humain. Cette étude montre que le polymorphisme d'un seul nucléotide dans l'intron 7 du gène codant pour le PPAR α est fortement associé à l'HVG humaine (*Jamshidi et al., 2002*). Toutefois, bien que le gène codant pour le PPAR α soit aujourd'hui considéré comme un gène candidat impliqué dans la

réponse hypertrophique du muscle cardiaque, d'autres études sont nécessaires avant de pouvoir le confirmer. Néanmoins, les PPAR α s'avèrent être des cibles potentielles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de l'hypertrophie cardiaque (*Barger et al., 2000a*).

Il convient de souligner que bien que le remodelage métabolique du cœur hypertrophique décrit ci-dessus semble à prime abord être une conséquence du développement de l'hypertrophie, plusieurs évidences de la littérature indiquent que des altérations du métabolisme cardiaque peuvent également précéder le développement de l'hypertrophie ou même en être la cause. À titre d'exemple, le rôle crucial de la β -oxydation des AGCL dans le développement de l'hypertrophie cardiaque est souligné par le fait que des sujets porteurs de mutations dans les gènes codant pour des enzymes de la β -oxydation des acides gras ou jouant un rôle dans sa régulation, telles que la MCD (*Surendran et al., 2001*) et l'AMPK, développent des cardiomyopathies hypertrophiques (*Kelly et al., 1994; Roe et al., 1995; Blair et al., 2001*). D'ailleurs, l'hypertrophie cardiaque peut être induite suite à l'administration d'un inhibiteur pharmacologique de la voie d'oxydation mitochondriale des AGCL, tel l'étomoxir (*Saburi et al., 2003; Rupp et al., 1992*).

Dans l'ensemble, le remodelage métabolique du cœur hypertrophique peut être considéré comme adaptatif puisque le cœur améliore son efficacité cardiaque en terme de quantité d'ATP produite par oxygène consommé. Toutefois, il est possible que ce remodelage métabolique limite la capacité du cœur à générer suffisamment d'ATP dans des conditions où la demande en énergie est augmentée par une plus grande charge de travail.

Il est à noter que des altérations chroniques du métabolisme des substrats dans le cœur hypertrophique pourraient également résulter de changements dans le statut du stress oxydatif, une caractéristique du cœur hypertrophique (*Lesnefsky et al., 2001*). De fait, l'augmentation de la production de radicaux libres, en particulier dans la mitochondrie, peut engendrer l'inactivation d'enzymes du métabolisme des substrats ou du cycle de Krebs, telles que la PDH, l'aconitase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase (*Cheung et al., 1998; Humphries et al., 1998; Sadek et al., 2002*). Ces altérations métaboliques sont considérées comme maladaptives puisqu'elles

compromettent la capacité du cœur à produire de l'énergie (*Lucas et al., 1998*). Bien qu'en phase d'hypertrophie compensée l'activité des enzymes antioxydantes est augmentée, elle diminue lorsque le cœur progresse vers la décompensation (*Tokoro et al., 1996; Dhalla et al., 1996*). En fait, selon la littérature actuelle, la dysfonction mitochondriale jouerait un rôle central dans la progression de la maladie d'un stade d'hypertrophie compensée vers un stade de décompensation et éventuellement, de défaillance (*Lesnefsky et al., 2001*).

Il existe toutefois très peu d'études sur le métabolisme des substrats dans le cœur défaillant et les données sont souvent controversées (*Stanley et al., 2002*). Le cœur défaillant semble incapable d'oxyder les acides gras sans qu'il n'y ait d'augmentation compensatoire suffisante de l'utilisation du glucose puisque, entre autres, l'expression des transporteurs GLUT1 est régulée à la baisse (*Osorio et al., 2002; Davilan-Roman et al., 2002*). Il est pertinent de mentionner que Liao et ses collaborateurs ont récemment généré une lignée de souris surexprimant le transporteur de glucose GLUT1, ayant de ce fait la capacité de prévenir la baisse des fonctions contractiles du myocarde défaillant via la préservation du métabolisme glucidique (*Liao et al., 2002*). Ainsi, l'augmentation de la quantité et de l'activité d'une seule protéine clé du métabolisme glucidique pourrait prévenir la régression du cœur d'un stade d'adaptation à un stade de décompensation (*Taegtmeyer et al., 2002a*). Selon Taegtmeyer, les résultats de cette étude mettent l'accent sur un concept important : « le métabolisme n'est pas un simple observateur dans le contrôle de l'expression génique cardiaque » (*Taegtmeyer et al., 2002a*).

Finalement, il est important de prendre en considération que lors d'études réalisées chez l'animal, les changements chroniques observés peuvent être corrélés avec un stade spécifique de progression de la maladie cardiaque. À l'inverse, les résultats obtenus suite à des analyses d'échantillons humains sont plus difficiles à interpréter vu la difficulté à déterminer avec précision le stade de la maladie. Néanmoins, il est intéressant de noter qu'une étude récente réalisée chez l'humain spécifie que le cœur défaillant retourne à un profil génétique reflétant le métabolisme fœtal via une régulation à la baisse de la transcription des gènes adultes et non pas via une régulation à la hausse des gènes fœtaux (*Razeghi et al., 2001a*).

I.7.3 Le citrate et le malonyl-CoA : les implications cliniques

Étant deux molécules au centre de la régulation concertée des glucides et des lipides, de même que deux des principales molécules à l'étude lors des travaux présentés dans cette thèse, le citrate et le malonyl-CoA font l'objet de la présente section où il sera brièvement question de leur implication au niveau clinique.

Grâce à des études métaboliques réalisées dans les années 80 auprès de patients atteints de maladies des artères coronaires, l'équipe de Thomassen met en évidence la présence d'une corrélation entre l'ampleur de l'efflux de citrate dans le sinus coronarien et la gravité de la maladie coronarienne (*Nielsen et al., 1980; Bagger et al., 1981; Thomassen et al., 1983; Thomassen et al., 1989*). Compte tenu de l'imperméabilité de la membrane mitochondriale au passage du citrate, l'équipe de Thomassen ont proposé en 1983 un mécanisme de formation de citrate cytosolique impliquant la NADP⁺-isocitrate déshydrogénase (NADP⁺-ICDH) et l'alanine aminotransférase. Une hausse de la captation de glutamate par le cœur de patients atteints de maladies cardiaques permettrait la formation d' α -cétoglutarate, d'isocitrate et enfin de citrate dans le cytosol. De fait, dans les années 70, l'équipe de Mudge avait rapporté une hausse de la captation du glutamate accompagnée d'un efflux coronarien d'alanine et de citrate lors d'une étude réalisée auprès de patients atteints de maladies ischémiques. Ceci qui fut par la suite confirmé par Thomassen et ses collaborateurs au début des années 80 (*Mudge et al., 1976; Thomassen et al., 1983*). Dans l'ensemble, ces études suggèrent qu'une dysrégulation du métabolisme du citrate soit impliquée dans certaines pathologies cardiaques.

Concernant l'implication clinique du malonyl-CoA, les exemples qui suivent indiquent qu'une dysrégulation de son métabolisme soit présente dans certaines pathologies, telles que le diabète, la maladie ischémique et les cardiomyopathies hypertrophiques. Dans toutes ces conditions, il est proposé que cette dysrégulation compromette la production d'énergie par le cœur et par le fait même son fonctionnement normal (*Stanley et al., 1997a*). Des études réalisées sur des cœurs de rats diabétiques perfusés *ex vivo* (diabète de type I), ont documenté des niveaux de malonyl-CoA plus faibles que ceux retrouvés dans les cœurs de rats sains. Cette baisse du malonyl-CoA, qui serait associée à une diminution de l'activité de l'ACC

sans changement de son expression (*Stanley et al., 1997a*), aurait pour conséquence une suppression de l'inhibition de la CPT-I, favorisant ainsi l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (*Lopaschuk et al. 1994a, Saddik et al., 1993*).

D'autre part, le syndrome d'ischémie-reperfusion s'avère également être une condition caractérisée par des fluctuations de la concentration tissulaire de malonyl-CoA. Des études réalisées sur des cœurs perfusés *ex vivo* ont démontré qu'un protocole d'ischémie-reperfusion diminue les niveaux tissulaires de malonyl-CoA (*Dyck et al., 1998*). Cette baisse résulterait de l'effet combiné de (i) une diminution de l'activité de l'ACC, suite à sa phosphorylation par l'AMPK, laquelle serait favorisée par la déplétion des réserves énergétiques du cœur, et (ii) un maintien de l'activité de la MCD (*Dyck et al., 1998*). Il semble que cette baisse soit responsable, du moins en partie, des taux élevés de β -oxydation des AGCL documentés dans les cœurs reperfusés, une condition métabolique associée à une faible récupération des fonctions contractiles (*Lopaschuk et al., 1994a*). En effet, la baisse du niveau de malonyl-CoA lèverait l'inhibition de la CPT-I, entraînant ainsi l'accélération de l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie, et donc leur β -oxydation.

Suivant les considérations mentionnées ci-dessus, il apparaît qu'une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des niveaux de malonyl-CoA tissulaire permettrait de proposer des interventions pharmacologiques visant à normaliser le taux de β -oxydation des AGCL. Il s'agit du moins d'une avenue qui est préconisée par le groupe de Lopaschuk. Mis à part l'inhibition pharmacologique de la CPT-I, des cibles clés de cette approche thérapeutique seraient les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation du malonyl-CoA, c'est-à-dire l'ACC et la MCD, respectivement (*Dyck et al., 1998*). De plus, l'identification du ou des précurseurs métaboliques du malonyl-CoA cytosolique pourrait également permettre de suggérer d'autres interventions.

1.8 Les agents pharmacologiques et le métabolisme cardiaque

Traditionnellement, les approches pharmacologiques pour le traitement de la maladie ischémique impliquent des interventions visant à diminuer la demande en oxygène par le muscle cardiaque, tels que les antagonistes des récepteurs adrénergiques (*Lopaschuk, 2001a*). Administrées de façon aiguës ou chroniques, ces interventions

thérapeutiques améliorent le pronostic des patients en (i) améliorant la survie post-infarctus, (ii) réduisant la fréquence et la sévérité des crises d'angine, de même qu'en (iii) améliorant la tolérance à l'exercice (Wolff et al., 2002). Il est généralement accepté que les antagonistes des récepteurs adrénergiques agissent en réduisant la demande en oxygène par le myocarde suite à une baisse du rythme cardiaque, de la pression sanguine et de la contractilité (Wolff et al., 2002). Il est également proposé que l'effet bénéfique des β -bloqueurs provient de leur capacité d'empêcher l'activation de la lipase induite par les catécholamines (Wolff et al., 2002; Stanley et al., 2002). Récemment, une approche alternative a été proposée où les agents utilisés ont pour cible le métabolisme des substrats. Cette approche thérapeutique vise à augmenter l'efficacité du cœur à utiliser l'oxygène pour produire son énergie (Lopaschuk et al., 2002a). La présente section fait un bref recensement des thérapies et agents pharmacologiques ayant un impact direct sur le métabolisme du myocarde.

Plusieurs types de thérapies ou d'agents pharmacologiques ont fait l'objet de recherches dans le but de promouvoir un renversement métabolique d'une utilisation préférentielle des lipides vers les glucides. Cette approche est basée sur les notions suivantes. D'abord, les lipides ne sont pas aussi efficaces que les glucides à produire de l'énergie en terme d'oxygène consommé par quantité d'ATP produite (Tableau VI) (Lopaschuk, 2001a). De plus, dans une condition où l'apport en oxygène est très restreint, la glycolyse est la seule voie métabolique pouvant produire de l'ATP, ce qui s'avère cruciale au maintien de l'activité des pompes ioniques (Hue et al., 2002). Ainsi, dans une condition ischémique où les glucides et les lipides compétitionnent pour l'oxygène résiduel, l'utilisation préférentielle des glucides s'avère être favorable en terme d'efficacité cardiaque, c'est-à-dire de travail cardiaque fourni par quantité d'oxygène consommé.

La thérapie glucose-insuline-potassium (GIK), introduite dans les années 60 par Sodi-Pallares et ses collaborateurs, fut la première à favoriser l'utilisation du glucose en période d'ischémie (Sodi-Pallares et al., 1962). À cette époque, cette thérapie avait pour but principal de rétablir la perte de potassium par les cellules ischémiques et par le fait même de restaurer le potentiel membranaire à des valeurs normales (Lopaschuk et al., 2002b). Aujourd'hui, avec l'avancement des connaissances, cette thérapie est plutôt utilisée pour les effets bénéfiques de l'apport en insuline et en

glucose. Elle augmente la captation de glucose, et diminue la captation et le niveau d'acides gras libres. De fait, l'administration de la solution GIK, baisse significativement le taux de morbidité et de mortalité hospitalière chez les patients en infarctus aigu (*Janiger et al., 2002; Fath-Ordoubadi et al., 1997*). Ce traitement s'avère donc très prometteur d'autant plus qu'il est sécuritaire et économique. Toutefois, même après quarante ans d'études, la thérapie GIK n'est toujours pas recommandée pour une utilisation de routine (*Fath-Ordoubadi et al., 1997; Diaz et al., 1998; Ceremuzyński et al., 1999*). Les variabilités des posologies, durées et voies d'administration du traitement entre les diverses études cliniques font en sorte que les conclusions sur l'utilisation de la thérapie GIK ne sont toujours pas unanimes (*Janiger et al., 2002*). En outre, une étude polonaise, catégorisée parmi les études les mieux dessinées de l'ère post-thrombolytique, a été prématurément interrompue suite à une augmentation de la mortalité des patients traités avec la solution GIK (*Ceremuzyński et al., 1999*).

Par la suite, à la fin des années 80 et au début des années 90, plusieurs agents pharmacologiques sont apparus, lesquels avaient pour but de stimuler l'oxydation mitochondriale des glucides dans le cœur ischémié. Cette stratégie a été basée en grande partie sur les travaux de Lopaschuk et ses collaborateurs, lesquels avaient souligné l'importance d'une amélioration du couplage entre la glycolyse et l'oxydation du glucose (*Lopaschuk, 2001a*). Selon ces chercheurs, un bon couplage évite une surproduction de protons et donc l'acidose qui pourrait être à l'origine des dysfonctions contractiles. Afin d'augmenter l'oxydation mitochondriale du glucose, deux stratégies ont été proposées lesquelles avaient pour cible principale une activation directe de la PDH, ou indirecte suite à une inhibition de la β -oxydation des acides gras. Parmi les agents pharmacologiques utilisés on retrouve dans la première catégorie, le dichloroacétate et dans la deuxième catégorie, la ranolazine, l'oxfenicine, le perhexiline, l'étomoxir et la trimétazidine (TMZ) (*Stacpoole, 1989; McVeigh et al., 1990; Lewandowski et al., 1995; McCormack et al., 1996*).

Bien que les inhibiteurs de la CPT-I, tel l'étomoxir, semblaient initialement une avenue très prometteuse, la TMZ est le seul parmi tous ces agents pharmacologiques à être présentement utilisé en clinique pour le traitement de la maladie ischémié, plus spécifiquement l'angine de poitrine (*McLellan et al., 1999*;

Kantor et al., 2000; Wolff et al., 2002; Lopaschuk, 2001b). La TMZ est une drogue qui inhibe une enzyme impliquée dans la β -oxydation des acides gras, soit la 3-cétoacyl-coenzyme A thiolase. Elle réduit les symptômes d'angine chez les patients sans entraîner d'effets secondaires sur les paramètres hémodynamiques (*Kantor et al., 2000*). Quant aux traitements impliquant des inhibiteurs de la CPT-I, ceux-ci ont démontré de nombreux effets bénéfiques lors d'études réalisées *ex vivo* et *in vivo* tant chez l'animal que chez l'humain (*Zarain-Herzberg et al., 1999; Bristow, 2000; Wolff et al., 2002*). Cependant, des problèmes de toxicité ont été recensés suite à leur utilisation à long terme. Parmi les effets secondaires observés, on dénote entre autres, le développement d'hypertrophie cardiaque et de neuropathies (*Stanley et al., 1997b; Kantor et al., 1999*). Suite à ces résultats mitigés, il a été proposé que les interventions pharmacologiques devraient cibler davantage les enzymes impliquées dans le métabolisme du malonyl-CoA, l'inhibiteur naturel de la CPT-I (*Kantor et al., 1999*). Il est à noter que des études cliniques sont en cours concernant l'utilisation de la ranolazine (*Lopaschuk et al., 2002b*), un autre inhibiteur de la voie de β -oxydation dont la cible moléculaire n'a toutefois pas encore été publiée (*Wolff et al., 2002*).

Par ailleurs, l'oxydation du glucose peut également être stimulée par des agents non pharmacologiques, tels que la carnitine et ses dérivés (*Wolff et al., 2002*). La carnitine augmenterait l'activité de la PDH via une baisse du ratio acétyl-CoA/CoA, tel que suggéré par des études dans le cœur de rat perfusé (*Broderick et al., 1993*). Chez des patients atteints de cardiomyopathie, l'administration de carnitine diminue le taux de mortalité, alors que chez les patients ayant subi un infarctus, elle limite le développement de l'HVG (*Rizos et al., 2000; Colonna et al., 2000*). En outre, la L-propionylcarnitine, un dérivé naturel de la carnitine, semble avoir des effets anti-ischémiques supérieurs à ceux de la carnitine (*Schonekess et al., 1995*). On attribue cette différence au fait que la L-propionylcarnitine pénètre mieux les cellules et qu'elle pourrait fournir un substrat anaplérotique au CAC via la formation de propionyl-CoA (*Russell et al., 1995*). Ce dernier est converti en succinyl-CoA, puis en succinate. Il est à noter que la carnitine et la L-propionylcarnitine ne sont pas utilisées en clinique présentement toutefois, de nombreuses études récentes rapportent des résultats prometteurs (*Colonna et al., 2000; Wolff et al., 2002*).

En résumé, des approches pharmacologiques et/ou non pharmacologiques sont proposées et investiguées dans le but d'augmenter l'oxydation des glucides aux dépens des lipides, dans le cœur ischémique. L'étiologie complexe de la défaillance cardiaque ainsi que le caractère multifactoriel de la maladie cardiaque, où les effets dus à l'infarctus du myocarde s'ajoutent souvent à l'hypertrophie cardiaque, au diabète, et/ou à la maladie des artères coronaires, compliquent le développement de nouveaux agents pharmacologiques ciblant le métabolisme cardiaque. La durée de même que la sévérité de l'atteinte cardiaque sont des facteurs ayant une influence majeure sur le phénotype métabolique du cœur. Il est donc primordial que les recherches futures en pharmacothérapies tiennent compte de ces faits afin d'optimiser les traitements disponibles. Ainsi, le concept de protection métabolique du myocarde ischémique est en constante évolution (*Opie et al., 2002*). En outre, il apparaît crucial que dans l'avenir la conception de nouveaux agents devrait intégrer les nouvelles notions sur la régulation génique du métabolisme cardiaque.

I.9 Les approches méthodologiques pour l'investigation du métabolisme cardiaque

I.9.1 La perfusion du cœur isolée de rat

La perfusion du cœur *ex vivo*, c'est-à-dire le maintien des fonctions contractiles et métaboliques de l'organe à l'extérieur de son milieu physiologique, est une technique très utilisée pour l'étude du métabolisme cardiaque. Les deux principaux systèmes de perfusion de cœurs sont le modèle de Langendorff et le modèle du « cœur au travail ». Ils peuvent être adaptés pour un cœur de rat ou un cœur de souris. Toutes les analyses présentées dans cette thèse ont été réalisées chez le rat. Il est à noter que le modèle de souris, bien que plus exigeant d'un point de vue technique de par la petitesse de l'organe, offre une plus grande diversité de modèles génétiques de pathologie. Les sous-sections suivantes présentent brièvement les deux techniques de perfusion de cœurs, plus particulièrement leur fonctionnement, leurs avantages et leurs inconvénients.

I.9.1.1 Le modèle Langendorff

Le modèle de perfusion de cœurs de rats isolés selon la méthode d'Oscar Langendorff a depuis longtemps fait ses preuves pour la recherche dans le domaine cardiovasculaire. Cette approche a vu le jour à la fin du 19^e siècle et elle est encore

aujourd'hui d'une très grande utilité pour l'étude du métabolisme cardiaque de par sa stabilité et sa versatilité. Ce modèle est utilisé, entre autres, pour l'étude de la régulation des substrats énergétiques, des mécanismes d'utilisation des glucides et des lipides, de la synthèse protéique, de la contractilité et de la consommation d'oxygène (*Taegtmeyer, 1995*). La mise en évidence du « cycle de Randle », mentionné précédemment, fut réalisée grâce à l'utilisation de cette technique de perfusion. En outre, les perfusions Langendorff sont grandement utilisées dans le domaine de la pharmacologie.

Les fondements de cette technique de perfusion résident dans la fermeture de la valve aortique afin de prévenir le passage du tampon de perfusion à l'intérieur du ventricule gauche. C'est grâce à la pression hydrostatique de 70 mmHg exercée par le système que la valve aortique demeure fermée. De ce fait, suite à la canulation de l'aorte, le tampon de perfusion pénètre les artères coronaires, c'est-à-dire les artères subvenant à tous les besoins métaboliques du muscle cardiaque, dont l'embouchure est située juste au-dessus de la valve aortique (*Taegtmeyer, 1995*). Ainsi, l'organe est perfusé en mode retrograde : le cœur bat mais que puisque sa cavité ventriculaire ne peut se remplir il n'éjecte pas de perfusat ne développant ainsi qu'une faible tension interne et par le fait même un faible travail (*Evans et al., 2000*). Les études métaboliques de la première phase de cette thèse ont été réalisées grâce à l'utilisation de cette technique de perfusion.

1.9.1.2 Le modèle du « cœur au travail »

Bien que la préparation de cœur perfusé *ex vivo* selon le modèle de Langendorff soit avantageuse de par la simplicité de sa technique et de son appareillage, le muscle cardiaque ainsi perfusé n'est soumis à aucune pré- ou post-charge physiologique. C'est pourquoi dans les années 60 la préparation du « cœur au travail » à vue le jour grâce à l'équipe de Neely, Morgan et leurs collaborateurs (*Neely et al., 1967; Neely et al., 1975*). Elle fut par la suite modifiée au début des années 80 par Taegtmeyer et ses collaborateurs (*Taegtmeyer et al., 1980*). Cette technique de perfusion est aujourd'hui largement utilisée que ce soit pour l'étude du métabolisme, de la mécanique, de la physiologie ou encore de la biochimie cardiaque. Les fondements de cette technique de perfusion résident dans la canulation de l'oreillette gauche et de l'aorte de telle sorte que la moitié gauche de l'organe est perfusée (Figure 13).

Le tampon de perfusion pénètre le muscle cardiaque par l'oreillette gauche puis remplit le ventricule gauche via l'ouverture de la valve mitrale au moment de la diastole, développant ainsi une tension interne dans la chambre du cœur. Le débit de liquide pénétrant dans l'oreillette gauche est contrôlé par la pression hydrostatique de 11,5 mmHg, appelée la pré-charge. La contraction du myocarde au moment de la systole entraîne l'éjection du tampon, via l'aorte, jusqu'au sommet de la colonne de perfusion à une pression de 80 mmHg, appelée la post-charge. De ce fait, à chaque contraction le muscle exerce un travail mécanique. C'est au moment de la diastole que le tampon de perfusion pénètre à l'intérieur des artères coronaires afin de subvenir au métabolisme cardiaque grâce à la présence des nutriments, des ions et de l'oxygène.

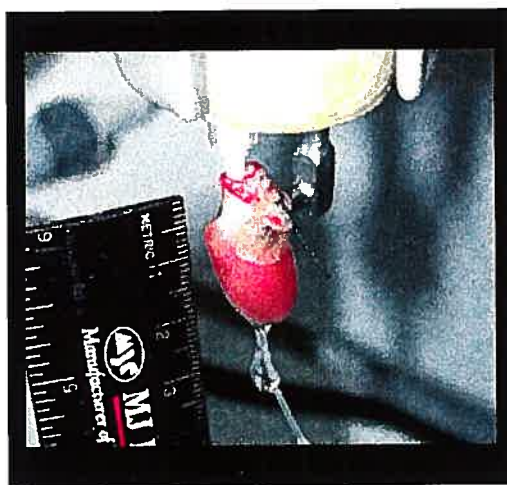


Figure 13. Photographie illustrant les trois canules insérées dans le muscle cardiaque : la canule aortique, la canule de la veine pulmonaire et la canule intra-ventriculaire

On retrouve dans la ligne de la post-charge une petite chambre de verre, appelée la chambre de compliance. Elle contient une proportion de tampon de perfusion et une proportion d'air finement calculée permettant de simuler la compliance aortique. L'appareillage très sophistiqué du système de perfusion de « cœur au travail » inclut également la présence de débitmètres et de transducteurs de pression. Un transducteur de pression, relié à une fine canule insérée à l'apex du ventricule gauche, permet la mesure constante des fonctions intra-ventriculaires. C'est grâce à

la mesure des débits cardiaques et des fonctions contractiles intra-ventriculaire que la puissance cardiaque peut être calculée (*Lopaschuk et al., 1997*).

Le cœur perfusé *ex vivo* selon le modèle du « cœur au travail » s'avère une technique très performante pour l'investigation du métabolisme cardiaque autant dans des conditions physiologiques que pathologiques. Cette méthodologie permet de cibler l'étude d'un paramètre à la fois, tels que l'effet de la charge de travail ou d'un certain mélange de substrats métaboliques, tout en soustrayant l'impact de d'autres facteurs, telles que l'influence hormonale ou la disponibilité des nutriments (*Evans et al., 2000*). La possibilité de mesurer la différence entre la concentration artérielle et la concentration veineuse d'une molécule marquée, en parallèle avec la mesure du débit coronarien, permet l'étude de la captation et de la libération des divers substrats énergétiques par le muscle cardiaque.

En résumé, le « cœur au travail » s'avère un modèle de choix pour la mesure des fonctions contractiles et l'étude des diverses facettes du métabolisme cardiaque. Le montage de perfusion finement élaboré permet de reproduire et de respecter davantage la physiologie de l'animal. C'est pourquoi, suite à la mise au point du système, la deuxième phase des recherches présentées dans cette thèse ont été réalisées à l'aide de ce modèle de perfusion (Figure 14). Il est à noter que certaines modifications techniques ont été apportées au montage conventionnel décrit dans la littérature (*Barr et al., 2000*) afin d'assurer un contrôle exact des pressions de perfusion et de permettre des analyses métaboliques utilisant trois traceurs à la fois. De ce fait, le système de perfusion a été converti en mode semi-recirculant afin d'éviter la recirculation des traceurs métabolisés.

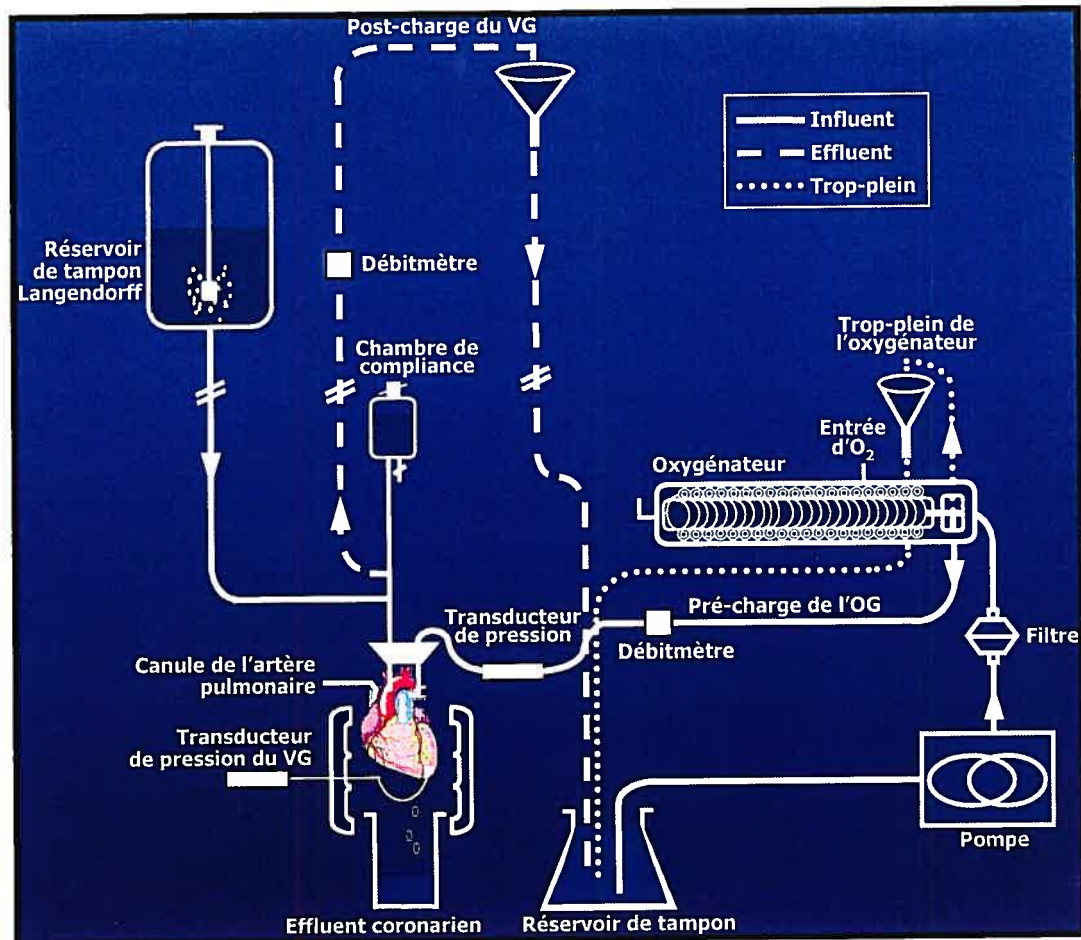


Figure 14. Représentation schématique du montage de perfusion du « cœur au travail » en mode semi-recirculant (adapté de Vincent et al., 2003)

OG, oreillette gauche; VG, ventricule gauche

1.9.2 L'utilisation des traceurs isotopiques pour l'investigation du métabolisme cardiaque

La présente étude du métabolisme cardiaque est basée sur l'utilisation des traceurs isotopiques. Le traceur est un outil d'investigation très intéressant étant donné qu'il permet de suivre le devenir métabolique d'une molécule dans l'organisme. Une fois introduit dans un compartiment cellulaire donné, le devenir métabolique du traceur est identique à celui de la molécule tracée (Chambrier et al., 1988).

Les isotopes d'un atome sont l'ensemble des éléments ayant la même place dans la classification du tableau périodique de Mendeleïev. Ils ont le même numéro atomique mais possèdent des nombres de masse différents, c'est-à-dire qu'ils diffèrent par leur

nombre de neutrons. Les isotopes stables diffèrent des isotopes radioactifs de par leur stabilité énergétique, c'est-à-dire qu'ils n'émettent pas de radiations. On peut les identifier et/ou les mesurer par spectrométrie de masse ou par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN). Au début des années 50, la mise en marché de compteurs de radioactivité à scintillation liquide et la disponibilité d'un grand nombre de traceurs radioactifs ont favorisé l'utilisation des radio-isotopes dans les études métaboliques. Cependant, l'utilisation de radio-isotopes chez l'humain dans des expériences à but non thérapeutique, notamment chez l'enfant et la femme enceinte, pose un problème d'éthique. Ainsi, malgré leur coût, les traceurs marqués aux isotopes stables, de par leur innocuité et la simplification récente de leur analyse, sont préférables aux traceurs radioactifs. Depuis les années 70, l'introduction sur le marché de modèles moins coûteux de CGSM a permis l'utilisation à grande échelle des isotopes stables pour les études métaboliques *in vivo*. Plusieurs études ont démontré que l'utilisation des isotopes stables couplée à l'analyse d'isotopomères de masse est un outil puissant d'investigations métaboliques (Hazey *et al.*, 1997; Kien *et al.*, 1996; Large *et al.*, 1997; Comte *et al.*, 1997a; Comte *et al.*, 1997b).

Dans notre étude, nous avons utilisé des substrats marqués au carbone 13 (^{13}C) ou au deutérium (^2H) et le principe d'analyse des isotopomères de masse par CGSM. Les notions relatives à la compréhension de cette méthodologie seront donc présentées de façon plus détaillée dans cette présente section.

I.9.2.1 Les isotopes stables : définition et nomenclature

Tel que mentionné, les isotopes d'un élément ne diffèrent entre eux que par leur masse, c'est-à-dire leur nombre de neutrons. Par exemple, l'isotope ^{13}C , qui comporte un neutron de plus que le ^{12}C , est un isotope stable dont la masse atomique est de 13,00335 et dont l'abondance naturelle varie de 1,01% à 1,15% du carbone total (Wolfe, 1992). L'abondance relative des principaux éléments trouvés dans les composés organiques est rapportée au Tableau X. Les isotopes stables sont présents naturellement en faible proportion. En effet, il existe des composés ayant une abondance naturelle en isotopes stables et des composés enrichis par synthèse d'un ou plusieurs isotopes.

Tableau X. Abondance relative des principaux éléments présents dans les composés organiques (Wolfe, 1992)

| Élément | Masse Atomique | Abondance naturelle relative (%) |
|-----------------|----------------|----------------------------------|
| ¹ H | 1,07830 | 99,985 |
| ² H | 2,01410 | 0,015 |
| ¹² C | 12,00000 | 98,89 |
| ¹³ C | 13,00350 | 1,11 |
| ¹⁴ N | 14,00307 | 99,63 |
| ¹⁵ N | 15,00011 | 0,37 |
| ¹⁶ O | 15,99491 | 99,76 |
| ¹⁷ O | 16,99914 | 0,037 |
| ¹⁸ O | 17,99916 | 0,204 |

Une nomenclature simple permet de nommer de façon précise les molécules tracées fabriquées commercialement. Par exemple, concernant le [1-¹³C]oléate et le [U-¹³C]pyruvate, le premier chiffre indique le numéro de l'atome de carbone qui est marqué, tandis que la lettre « U », pour « Uniformément », signifie que tous les atomes de carbone de la molécule sont marqués. Les termes "isotopomères de masse" et "isotopomères de position" utilisés couramment dans la littérature médicale correspondent respectivement à "isotopologues" et "isotopomères" (Brunengraber et al., 1997). Les isotopomères de position sont des molécules qui possèdent des compositions isotopiques globales identiques mais qui diffèrent par la position des atomes lourds dans les molécules. À titre d'exemple, le [1-¹³C]pyruvate et le [3-¹³C]pyruvate sont des isotopomères de position. Les isotopomères de masse, quant à eux, sont des molécules qui diffèrent par leur nombre d'atomes lourds, ayant ainsi des poids moléculaires différents. À titre d'exemple, le [1-¹³C]pyruvate, le [1,2-¹³C₂]pyruvate et le [U-¹³C]pyruvate sont des isotopomères de masse. Dans le langage de la spectrométrie de masse ces molécules sont appelées respectivement M+1, M+2 et M+3 pyruvate ou plus simplement M1, M2 et M3 pyruvate. Lorsque seulement un élément d'un composé avec n atomes de ce type d'élément est marqué, le nombre possible d'isotopomères de masse est $n+1$ et le nombre d'isotopomères de position est 2^n .

I.9.3 La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM) : les aspects techniques

Le métabolisme peut être étudié grâce à de nombreuses techniques parmi lesquelles on retrouve la spectroscopie RMN (*Clarke et al., 1987; Malloy et al., 1988; Chatham et al., 2001b*), la tomographie à émission de positrons (PET) (*Henze et al., 1982; Nguyen et al., 1990*) et la CGSM (*Kien et al., 1996; Comte et al., 1997b; Brunengraber et al., 1997*). La technique de CGSM combine le haut pouvoir de résolution de la chromatographie en phase gazeuse et la haute sensibilité et spécificité de détection ionique du spectromètre de masse. Il est ainsi possible d'identifier et de quantifier avec précision des composés chimiques présents dans un mélange complexe (*Rocchiccioli, 1989*). Utilisée en combinaison avec des substrats marqués aux isotopes stables et l'analyse d'isotopomères de masse, la CGSM s'avère être une technique plus puissante que les techniques radio-isotopiques classiques et plus sensible que la RMN, tout en étant sécuritaire pour l'investigation métabolique tant dans l'organe isolé que chez l'humain (*Chambrier et al., 1988*).

I.9.3.1 Dérivation chimique des métabolites d'intérêt

L'analyse par CGSM d'un produit organique au sein d'un milieu biologique nécessite au préalable un traitement de l'échantillon comportant trois principales étapes. Premièrement, une purification partielle par déprotéinisation ou chromatographie par échange d'ions. Deuxièmement, une extraction à l'aide d'un solvant organique (éther, acétate d'éthyle), lequel sera par la suite éliminé par évaporation, et troisièmement, une dérivation chimique de l'analyte non volatil en un dérivé volatil stable (*Rocchiccioli, 1989*). La plupart des molécules organiques biologiques comportent des groupements polaires (-COOH, -C=O, -CH₂OH, -CHOH) qui les rendent peu volatils. La chromatographie gazeuse nécessite la transformation de ces molécules en dérivés apolaires et plus volatils (*Blau et al., 1993; Mc Lafferty, 1980*). Des réactions chimiques spécifiques permettent l'ajout de groupements alkyles afin de bloquer les groupements polaires de la molécule. En outre, la dérivation chimique de l'analyte améliore sa stabilité thermique et son taux de détection. Le mode de dérivation est choisi en fonction des critères suivants : (i) la nature des groupements polaires de la molécule, (ii) le comportement chromatographique du dérivé obtenu, (iii) le patron de fragmentation du dérivé dans le spectromètre de masse (formation de fragments ou d'ions moléculaires utilisables

pour la mesure d'enrichissement), (iv) la simplicité de préparation et (v) la stabilité du dérivé. Tous les métabolites étudiés lors de cette recherche ont été analysés sous la forme dérivée au *tert*-butyldiméthylsilyl (TBDMS).

1.9.3.2 La chromatographie en phase gazeuse

Le chromatographe utilisé lors de cette étude correspond au modèle Hewlett Packard 5890 Série II *Plus*. La colonne chromatographique est d'une longueur de 50 m et d'un diamètre interne de 0,2 mm. Brièvement, les molécules en solution sont introduites dans l'injecteur du chromatographe chauffé à haute température (250-300°C). Les molécules vaporisées pénètrent dans la colonne de chromatographie, laquelle est parcourue continuellement par un flux du gaz vecteur, c'est-à-dire l'hélium. Ce dernier circule dans la colonne avec un débit constant de 0,6-0,7 ml/min. La colonne est tapissée par une phase liquide non volatile, de structure et de polarité variables selon les composés à analyser. Les molécules se répartissent entre la phase liquide stationnaire et la phase gazeuse mobile en fonction de leur solubilité relative entre les deux phases. Le temps de rétention de la molécule, influencé par la température ainsi que la longueur de la colonne, est d'autant plus long que le composé est soluble dans la phase stationnaire et donc retenu par la colonne. Les différentes espèces moléculaires qui sortent du chromatographe passent dans le spectromètre de masse suivant un ordre constant, avec des temps de rétention spécifiques et reproductibles. Ces conditions chromatographiques doivent être optimisées afin de permettre une bonne résolution de séparation des composés à étudier et ce, en un temps raisonnable. Ainsi, la séparation des molécules d'intérêts est effectuée par la chromatographie en phase gazeuse. Une fois éluées de la colonne chromatographique les molécules diffusent directement dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse.

1.9.3.3 La spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse utilisé dans cette étude correspond au modèle Hewlett Packard 5972. Cet appareil est muni d'un détecteur quadripolaire composé de trois éléments : une chambre d'ionisation, un analyseur de masse et un détecteur à multiplicateur d'électrons. L'ensemble fonctionne sous vide, lequel est maintenu par des pompes à diffusion ou turbomoléculaires.

La chambre d'ionisation. À la sortie du chromatographe, les différentes molécules sont ionisées et fragmentées dans la chambre d'ionisation, communément appelée la source. L'ionisation se fait par impact électronique ou par ionisation chimique produisant ainsi des ions positifs et négatifs (*Mc Lafferty, 1980*). L'ionisation positive par impact électronique (bombardement des molécules par un flux d'électrons possédant une énergie fixe) se produit par la perte d'un électron périphérique de la molécule M et l'obtention d'une molécule ionique instable à nombre impair d'électrons, dit l'ion moléculaire M^+ . Par la suite, cet ion moléculaire se fragmente en une série d'ions de plus faibles masses, par ruptures de liaisons et/ou réarrangements moléculaires (*Rocchiccioli, 1989*). Cette fragmentation obéit à un certain nombre de lois, par exemple une molécule soumise à un processus d'ionisation donné générera toujours les mêmes ions, et ce dans les mêmes proportions. L'abondance relative et le rapport masse sur charge (m/z) des ions détectés constituent le spectre de masse de la molécule (Figure 15). Le processus de fragmentation est spécifique à la structure chimique de la molécule et les ions (ou fragments) observés constituent en quelque sorte son "empreinte digitale".

Dans le cas de l'ionisation chimique, les ions sont formés suite à des réactions entre un gaz réactionnel, tel que l'ammoniac et le méthane, à haute pression et les molécules non chargées du composé à analyser (*Rocchiccioli, 1989*). Ce type d'ionisation douce entraîne la formation d'un ion "quasi-moléculaire" à nombre pair d'électrons. Il correspond à la focalisation de tous les fragments observés en impact électronique sur un ion unique rendant ce signal plus intense. En effet, le gain dans la sensibilité de détection est alors d'un facteur variant de 100 à 10 000. La spécificité est d'autant plus augmentée que le signal observé en ionisation chimique correspond à la molécule entière. Les familles d'ions formées dans la source d'ionisation sont ensuite extraites, focalisées et accélérées par des lentilles successives de façon à obtenir un faisceau ionique dont toutes les particules ont la même énergie cinétique (*Rocchiccioli, 1989*).

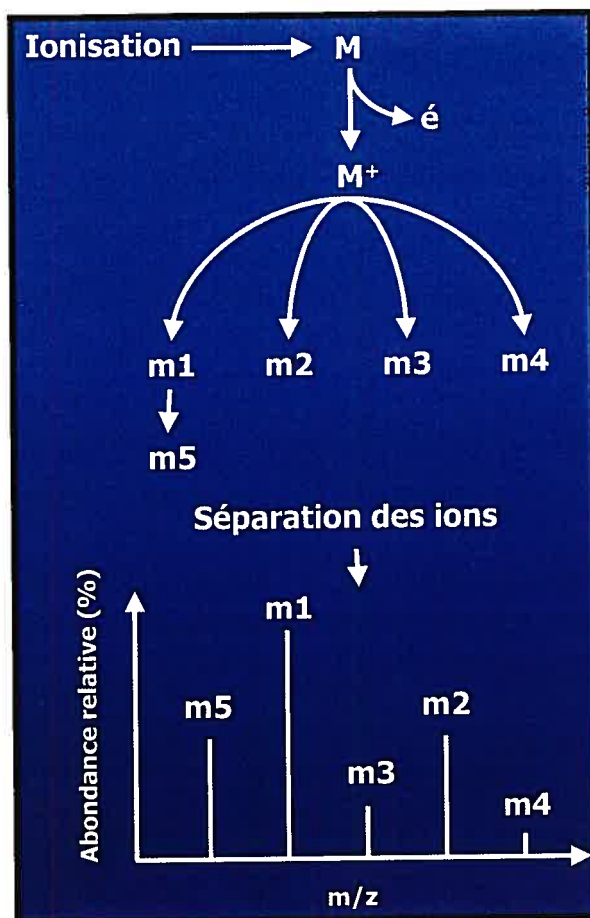


Figure 15. Représentation schématique du spectre de masse d'une molécule analysée par CGSM en mode d'impact électronique (*adapté de Rocchiccioli, 1989*)

La molécule M, éluée sous forme gazeuse de la colonne chromatographique, est ionisée par un faisceau d'électrons avec formation de l'ion moléculaire M⁺. Cet ion est instable et se fragmente ensuite en ions de plus faibles masses, lesquels sont séparés au niveau du quadripôle du spectromètre de masse.

L'analyseur de masse. L'analyseur de masse permet de disperser le faisceau d'ions moléculaires et de fragments obtenus dans la chambre d'ionisation, en faisceaux d'ions caractérisés par leur rapport m/z . Cette séparation se fait par un filtre quadripolaire ou par d'autres systèmes comme le piège ionique et le secteur magnétique (*Mc Lafferty, 1980*). Dans le cas de l'analyseur quadripolaire, les ions pénètrent dans un filtre de masse constitué de quatre barres métalliques conductrices, reliées deux à deux diagonalement, et soumises simultanément et par paire, à des voltages continus de haute fréquence (*Mc Lafferty, 1980; Rocchiccioli, 1989*). Le

champ électrodynamique créé est tel que seuls les ions caractérisés par un rapport m/z donné peuvent traverser l'analyseur pour atteindre le détecteur. Les ions de masses différentes oscillent avec une amplitude de plus en plus grande et se déchargent sur les barres. La masse des ions transmis le long du quadripôle est proportionnelle au voltage appliqué. Puisqu'on impose un balayage linéaire de voltage, les masses détectées varient linéairement. Les ions sont ainsi transmis par ce filtre dans l'ordre croissant ou décroissant des valeurs m/z .

Deux types d'analyse peuvent être effectués sur cet appareil. L'analyse en mode SCAN (balayage) est utilisée pour l'obtention de spectres de masse, et l'analyse en mode SIM (« selected ion monitoring »), c'est-à-dire le suivi d'ions présélectionnés, est utilisée pour l'analyse d'isotopomères de masse ou pour des analyses quantitatives par dilution isotopique.

Le détecteur à multiplicateur d'électrons. Le détecteur est constitué d'un collecteur qui recueille le signal ionique. En effet, les ions qui arrivent au collecteur produisent un courant d'électrons proportionnel à l'abondance de chaque ion. Ce courant électronique est amplifié par un multiplicateur d'électrons, puis transformé en un signal logique, utilisable par un ordinateur. Ainsi, les valeurs des rapports m/z sont proportionnelles aux amplitudes des voltages enregistrés et sont calculées par rapport à un calibrage électronique préalablement réalisé au moyen de composés de référence présentant des espèces ioniques connues dans toute la gamme des masses étudiées. Afin d'améliorer la sensibilité de l'appareil aux molécules de hautes masses, des calibrations automatiques et manuelles sont effectuées avant chaque série d'analyses.

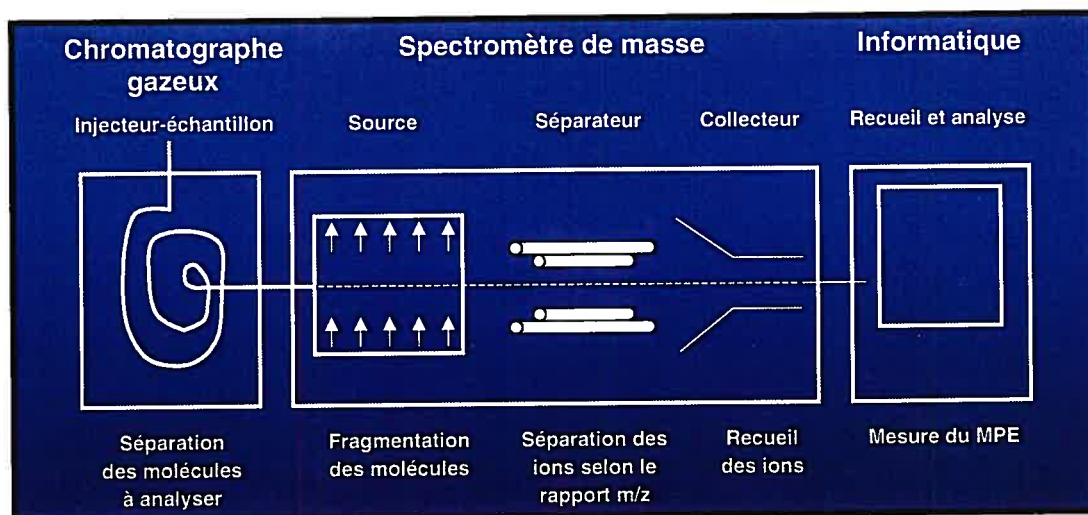


Figure 16. Représentation schématique d'un spectromètre de masse couplé à une chromatographie en phase gazeuse (adapté de Chambrier, 1988)

Le spectromètre de masse est utilisé comme détecteur sensible, sélectif et spécifique d'une molécule purifiée par le chromatographe. Le composé élué par le chromatographe est ionisé pour former des ions et des fragments spécifiques, lesquels sont ensuite analysés par l'analyseur de masse.

I.9.4 L'analyse du profil des isotopomères de masse

Calcul du pourcentage d'enrichissement molaire. L'enrichissement isotopique d'une molécule marquée par le métabolisme d'un traceur est exprimé en terme de pourcentage d'enrichissement molaire (MPE) (Équation 1). Ceci représente la proportion de molécules enrichies avec un nombre donné d'isotopes lourds par rapport à la totalité des autres molécules. Le MPE absolu de chaque isotopomère de masse marqué au ^{13}C (M_i) d'un métabolite donné, se calcule de la façon suivante:

$$\text{MPE}(M_i) = \% A_{M_i} / [A_M + \Sigma A_{M_i}] \quad (1)$$

où A_M et A_{M_i} représente l'aire sous la courbe du pic chromatographique, corrigée pour l'abondance isotopique naturelle, correspondant aux isotopomères de masses non marqués (M) et marqués au ^{13}C (M_i) respectivement où " n " représente le nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule ou dans le fragment analysé.

Calcul de correction pour l'abondance naturelle. Quelle que soit la façon d'exprimer l'enrichissement isotopique d'une substance, il faut déduire l'abondance naturelle des isotopes lourds (voir Tableau X). Plusieurs méthodes (*Des Rosiers et al., 1988; Lee et al., 1983; Mamer, 1988; Wolfe, 1992; Fernandez et al., 1996*) permettent d'effectuer cette correction. Le principe de la méthode de correction utilisée dans cette étude, soit celle développée par Mamer (*Mamer, 1988*) et Des Rosiers (*Des Rosiers et al., 1988*), est de résoudre une série de "n" équations à "n" inconnues, où "n" est égal au nombre d'ions analysés par CGSM. À titre d'exemple pertinent à la compréhension de cette étude, considérons l'analyse et le calcul de l'enrichissement du citrate isolé d'un cœur de rat perfusé avec des substrats marqués au ^{13}C . Les ions analysés par CGSM en mode SIM ont des masses (m/z) variant de 459 à 465. Ces ions correspondent au fragment $[\text{M}-57]^+$ et comprennent les six carbones, ^{12}C et/ou ^{13}C , du citrate. Afin de déterminer le pourcentage de molécules marquées avec 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ^{13}C , l'aire sous la courbe du pic correspondant à chaque ion (A_{459} à A_{465}) est corrigée pour l'abondance isotopique naturelle à l'aide des équations 2 à 8. Étant donné que sept ions sont analysés, on obtient sept équations à sept inconnus:

$$A_{459} = AC_{459} + F_1 \cdot AC_{460} + F_2 \cdot AC_{461} + F_3 \cdot AC_{462} + F_4 \cdot AC_{463} + F_5 \cdot AC_{464} + F_6 \cdot AC_{465} \quad (2)$$

$$A_{460} = F_7 \cdot AC_{459} + AC_{460} + F_8 \cdot AC_{461} + F_9 \cdot AC_{462} + F_{10} \cdot AC_{463} + F_{11} \cdot AC_{464} + F_{12} \cdot AC_{465} \quad (3)$$

$$A_{461} = F_{13} \cdot AC_{459} + F_{14} \cdot AC_{460} + AC_{461} + F_{15} \cdot AC_{462} + F_{16} \cdot AC_{463} + F_{17} \cdot AC_{464} + F_{18} \cdot AC_{465} \quad (4)$$

$$A_{462} = F_{19} \cdot AC_{459} + F_{20} \cdot AC_{460} + F_{21} \cdot AC_{461} + AC_{462} + F_{22} \cdot AC_{463} + F_{23} \cdot AC_{464} + F_{24} \cdot AC_{465} \quad (5)$$

$$A_{463} = F_{25} \cdot AC_{459} + F_{26} \cdot AC_{460} + F_{27} \cdot AC_{461} + F_{28} \cdot AC_{462} + AC_{463} + F_{29} \cdot AC_{464} + F_{30} \cdot AC_{465} \quad (6)$$

$$A_{464} = F_{31} \cdot AC_{459} + F_{32} \cdot AC_{460} + F_{33} \cdot AC_{461} + F_{34} \cdot AC_{462} + F_{35} \cdot AC_{463} + AC_{464} + F_{36} \cdot AC_{465} \quad (7)$$

$$A_{465} = F_{37} \cdot AC_{459} + F_{38} \cdot AC_{460} + F_{39} \cdot AC_{461} + F_{40} \cdot AC_{462} + F_{41} \cdot AC_{463} + F_{42} \cdot AC_{464} + AC_{465} \quad (8)$$

où F_n représente les facteurs de corrections qui sont, soit mesurés expérimentalement par CGSM via l'analyse des ions m/z 459 à 465 provenant de standards de citrate non marqués et marqués au ^{13}C (Équation 1), soit calculés théoriquement à l'aide de logiciels (*Fernandez et al., 1996*). Les aires corrigées (AC) des ions m/z 459 à 465 peuvent être déterminées en utilisant la fonction "matrice" d'un logiciel de chiffrier électronique. L'enrichissement en excès des ions m/z 459 à 465 (MPE) du citrate est calculé en utilisant les AC et l'équation 1.

Calcul de la vitesse d'efflux des métabolites. Il est à noter que lors des dosages quantitatifs d'une molécule, un standard interne marqué doit être utilisé. Il y a ensuite comparaison entre la quantité de molécules naturelles détectées par CGSM versus la quantité connue de standard interne. Par exemple, le standard interne de [$^2\text{H}_4$]citrate (M4) a été utilisé pour quantifier le citrate dans le perfusat effluent des cœurs perfusés. Le standard interne possède le même comportement chimique que le composé non marqué correspondant, et ce, au cours de l'extraction et de la dérivation. Le rapport d'aire sous la courbe du produit endogène et de son standard interne, multiplié par la concentration connue de standard interne, permet de calculer la concentration du produit endogène de façon très précise.

Calcul de la contribution relative des diverses voies métaboliques. La contribution relative des voies métaboliques permettant la formation d'OAA et d'acétyl-CoA, les deux substrats de la citrate synthase, est déterminée par l'analyse des cœurs perfusés en présence de divers mélanges de substrats marqués au carbone 13, lorsque l'équilibre isotopique est atteint. Parmi les substrats énergétiques marqués qui ont été utilisés pour les travaux présentés dans cette thèse, on retrouve le [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]lactate, le [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate, le [1 ou 1,2- $^{13}\text{C}_2$]octanoate et le [1 ou $\text{U-}^{13}\text{C}_{18}$]oléate. Le lactate et le pyruvate sont administrés en concentrations physiologiques et dans un rapport permettant que l'état rédox de la cellule soit maintenu constant. Le calcul de la contribution relative des diverses voies métaboliques nécessite la détermination, par des analyses en CGSM, de la distribution des isotopomères de masse (MID) du pyruvate ainsi que de la portion acétyl et OAA de la molécule de citrate. Tous les calculs permettant de déterminer la contribution relative des diverses voies métaboliques sont présentés dans les manuscrits de la présente thèse et décrits en détails dans l'article de Comte et ses collaborateurs retrouvé en annexe 1 (Comte et al., 1997b).

CHAPITRE II : OBJECTIFS DES TRAVAUX ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

La mise en contexte de cette étude et des trois publications a été présentée en avant-propos. De ce fait, ce chapitre présente brièvement les objectifs de recherche, le but spécifique commun aux trois publications et les hypothèses qui ont motivé les différents volets de cette étude.

II.1 Les objectifs de recherche

Une amélioration des taux élevés de mortalité et de morbidité liés aux maladies cardiovasculaires repose, entre autres, sur une meilleure compréhension des facteurs responsables des dysfonctionnements de contractilité observés chez les patients souffrants de ces maladies. À cet égard, les présents travaux de recherche mettent l'accent sur une meilleure compréhension du métabolisme cardiaque en conditions physiologique et pathologique. Le phénotypage métabolique du cœur sain et du cœur malade en lien avec la caractérisation de la cataplérose du citrate et de son rôle dans le contrôle métabolique de l'homéostasie cardiaque a été l'objectif général poursuivi lors de cette étude.

II.2 Le but spécifique

Afin de répondre aux objectifs, le but spécifique de cette étude était de caractériser le processus de cataplérose du citrate et sa régulation dans le cœur intact.

II.3 Les hypothèses de départ

Les recherches réalisées dans les trois manuscrits présentés dans les chapitres suivants ont été motivées par les hypothèses suivantes :

- (i) Le citrate cytosolique joue un rôle de molécule signal, régulant le choix des substrats énergétiques utilisés par le muscle cardiaque.
- (ii) Le citrate libéré dans l'effluent coronarien d'un cœur perfusé reflète la cataplérose du citrate mitochondrial, c'est-à-dire le transfert du citrate de la mitochondrie vers le cytosol.
- (iii) L'efflux de citrate vers le cytosol est un processus spécifique et régulé.
- (iv) L'efflux de citrate vers le cytosol peut être modulé en fonction de l'apport en substrats énergétiques pour la synthèse du citrate mitochondrial.
- (v) L'efflux du citrate vers le cytosol peut être modulé en fonction de la demande énergétique imposée au muscle cardiaque.

- (vi) La présence d'un inhibiteur du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques bloque l'efflux de citrate vers le cytosol.
- (vii) L'efflux de citrate vers le cytosol est augmenté dans une condition pathologique.

La réalisation de ce projet de recherche a été divisée en deux principales phases. La première consistait à documenter l'utilisation des substrats énergétiques par le cœur isolé, en relation avec la cataplérose du citrate, dans un système de perfusion Langendorff. La deuxième phase consistait à caractériser davantage ces procédés métaboliques dans un système de cœur perfusé « au travail » en présence de mélanges de substrats physiologiques. Au cours de cette dernière, une étude a été réalisée dans un modèle animal de pathologie cardiaque et une seconde chez l'animal sain. Les trois publications présentées ci-après apparaissent selon leur ordre de publication.

CHAPITRE III : MANUSCRIT I

CITRATE RELEASE BY PERFUSED RAT HEARTS: A WINDOW ON MITOCHONDRIAL CATAPLEROSIS

Geneviève Vincent, Blandine Comte, Myriame Poirier & Christine Des Rosiers
American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism 278:
E846-E856, 2000

Nom de la revue : *American Journal of Physiology*

Nom de l'éditeur : *Dr. M. Mueckler*

Identification de l'article : *Geneviève Vincent, Blandine Comte, Myriame Poirier & Christine Des Rosiers. Citrate release by perfused rat hearts : a window on mitochondrial cataplerosis. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 278: E846-E856, 2000*

Geneviève Vincent est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 : implications du citrate »

Dr. M. Mueckler

Nom de l'éditeur


Signature

7/2/03
Date

Geneviève Vincent

Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

***Geneviève Vincent, Blandine Comte, Myriame Poirier & Christine Des Rosiers.
Citrate release by perfused rat hearts : a window on mitochondrial cataplerosis
American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism
volume 278: E846-E856, 2000***

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Geneviève Vincent inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 : implications du citrate »

Dr Blandine Comte

07 avril 2003

Myriame Poirier

16 avril 2003

Dr Christine Des Rosiers

14 avril 2003

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Geneviève Vincent a contribué à l'élaboration du projet de recherche à tous les niveaux. Ceci inclut la définition de l'hypothèse et des objectifs de cette étude, ainsi que le choix des protocoles et la mise au point des techniques. Elle a réalisé toutes les expérimentations présentées dans ce manuscrit, et assumé la responsabilité de rédiger le manuscrit.

Le présent projet de recherche étant la continuité d'une étude réalisée par Dr Blandine Comte, cette dernière a grandement contribué à l'enseignement des techniques et des notions scientifiques reliées au sujet de cette recherche. Elle a participé aux diverses discussions tout au long de la réalisation du projet soumettant ses opinions concernant l'évaluation des résultats et l'orientation de l'étude. En outre, elle a contribué à la rédaction du manuscrit.

Les perfusions effectuées en présence du mélange de substrats physiologiques, correspondant au deuxième groupe d'expériences décrit dans ce manuscrit, ont été réalisées avec un système de perfusion Langendorff adapté à la présence d'albumine. L'adaptation du système de perfusion et la réalisation des expériences ont été effectuées conjointement par Myriame Poirier, étudiante à la maîtrise, et Geneviève Vincent.

Dr Christine Des Rosiers a directement supervisé et contribué à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

| | | |
|---------------------------------|--|---------------|
| Geneviève Vincent | | 7 avril 2003 |
| Dr Blandine Comte | | 07 avril 2003 |
| Myriame Poirier | | 10 AVRIL 2003 |
| Dr Christine Des Rosiers | | 14 avril 2003 |

CITRATE RELEASE BY PERFUSED RAT HEARTS: A WINDOW ON MITOCHONDRIAL CATAPLEROSIS

Geneviève Vincent¹, Blandine Comte², Myriame Poirier¹ & Christine Des Rosiers^{1,2}

Departments of Biochemistry¹ and Nutrition², University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, H3C 3J7.

Running title: **Cardiac citrate cataplerosis**

ABSTRACT

Cytosolic citrate is proposed to play a crucial role in substrate fuel selection in the heart. However, little is known about factors regulating the transfer of citrate from the mitochondria, where it is synthesized, to the cytosol. Further to our observation that rat hearts perfused under normoxia release citrate whose ¹³C labeling pattern reflects that of mitochondrial citrate (B. Comte, G. Vincent, B. Bouchard, and C. Des Rosiers. *J. Biol. Chem.* 272: 26117-26124, 1997), we report here data indicating that this citrate release is a specific process reflecting the mitochondrial efflux of citrate, a process referred to as cataplerosis. Indeed, measured rates of citrate release, which vary between 2 and 21 nmol/min, are modulated by the nature and concentration of exogenous substrates feeding acetyl-CoA (fatty acid) and oxaloacetate (lactate plus pyruvate) for the mitochondrial citrate synthase reaction. Such release rates which represent at most 2% of the citric acid cycle flux are in agreement with the activity of the mitochondrial tricarboxylate transporter whose participation is also substantiated by 1) parallel variations in citrate release rates and tissue levels of citrate plus malate, the antiporter, and 2) a lowering of the citrate release rate by 1,2,3-benzenetricarboxylic acid, a specific inhibitor of the transporter. Taken together, the results from the present study indicate that citrate cataplerosis is modulated by substrate supply, in agreement with the role of cytosolic citrate in fuel partitioning, and occurs, at least in part, through the mitochondrial tricarboxylate transporter.

Key words: energy metabolism; citric acid cycle; ¹³C mass isotopomer analysis; mitochondrial tricarboxylic acid transporter

INTRODUCTION

As the first intermediate committed to the citric acid cycle (CAC), citrate plays a crucial role in cardiac energy metabolism. However, its metabolic role may not be limited to the mitochondria. Indeed, cytosolic citrate is proposed to also play a central role in substrate fuel partitioning (for a recent review see Ref. 28). An increase in cytosolic citrate, after its efflux from the mitochondria where it is synthesized, could restrict 1) glucose utilization by inhibiting glycolysis at the level of phosphofructokinase (PFK; see Refs. 11 and 8 for review) and/or 2) long chain fatty acid (LCFA) β -oxidation following its conversion to malonyl-CoA, an inhibitor of carnitine palmitoyl transferase I (CPT-I; see Refs. 1, 19, 20, 31). The regulatory role of cytosolic citrate has long been recognized in lipogenic tissues such as the liver and adipose tissues, where it also supplies acetyl units for *de novo* fatty acid synthesis. In nonlipogenic tissues, a generalized theory of fuel sensing was formulated recently on the basis of experimental evidence obtained in β -cells (26) and skeletal muscle (28, 30, 31) whereby cytosolic citrate would act as a signal to cells that they have an excess of fuel for their immediate needs. Further investigations are, however, required to support such a mechanistic scheme in the heart.

In cardiac cells, a regulatory role for cytosolic citrate as an inhibitor of glycolysis was first proposed in 1963 by Garland et al. (11). However, the significance of mitochondrial citrate efflux, or cataplerosis, was questioned because of the low activity of the mitochondrial tricarboxylate transporter (5, 32). Nevertheless, a mitochondrial citrate efflux was demonstrated in isolated heart mitochondria (5, 14, 27). This efflux, which occurred in response to added malate, was favored at a high NADH/NAD⁺ concentration ratio or *state 4* respiration (14) and was restricted by 1,2,3-benzenetricarboxylic acid (BTC), a specific inhibitor of the mitochondrial tricarboxylate transporter (23). To the best of our knowledge, mitochondrial citrate cataplerosis has not been examined in the intact heart. However, cardiac citrate release has been documented *in vivo* in humans (33, 34) and *ex vivo* in the perfused rat heart (6, 7). Of potential clinical relevance, myocardial citrate release was increased in patients with coronary artery disease in a proportion that correlated with disease severity (33, 34). Furthermore, a relationship between cardiac citrate release

and mitochondrial citrate cataplerosis was suggested by our finding (6, 7) that rat hearts perfused with ^{13}C -labeled substrates release citrate whose ^{13}C labeling pattern reflects that of mitochondrial citrate. This finding, and the possibility that a dysregulated myocardial citrate release represents a specific chronic alteration of energy metabolism in patients with ischemic disease, prompted us to further examine this process.

The purpose of the present study was to elucidate factors modulating citrate release by the perfused rat heart. Citrate release rates were quantitated by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and flow rate measurements in hearts perfused under normoxia with various substrate mixtures, including physiological LCFA. In view of the crucial role of mitochondrial citrate in the CAC, we hypothesized that, if citrate release reflects mitochondrial citrate cataplerosis, it should be specifically modulated by 1) the energy demand, which is a determinant of citrate utilization by the CAC and 2) the supply of substrates for citrate synthesis, namely acetyl-CoA and anaplerotic oxaloacetate (OAA). Furthermore, the release of citrate should not be correlated with that of 1) lactate dehydrogenase (LDH), an index of membrane damage, or 2) the CAC intermediate succinate, an index of oxygen deprivation (16). Finally, provided that citrate release involves the mitochondrial tricarboxylate transporter, it should be inhibited by 1,2,3-BTC, but not by its inactive chemical analog, 1,2,4-BTC.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

Chemicals, organic solvents, enzymes, coenzymes, insulin, and BSA (fraction V) were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Quebec), Fisher Scientific (Montreal, Quebec), Sigma-Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), Anachemia (Dorval, Quebec), and ICN Canada (Montreal, Quebec). $[2,2,3,3\text{-}^2\text{H}_4]$ succinate, $[2,2,4,4\text{-}^2\text{H}_4]$ citrate, $[\text{U}\text{-}^{13}\text{C}_3]$ lactate (99%), $[\text{U}\text{-}^{13}\text{C}_3]$ pyruvate (99%), $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ oleic acid, and $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ octanoic acid (99%) were obtained from Isotec (Miamisburg, OH), Cambridge Isotopes Laboratories (Woburn, MA), and CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec). *RS*-3-hydroxy- $[2,2,3,4,4,4\text{-}^2\text{H}_6]$ butyrate (*RS*- $[^2\text{H}_6]$ BHB) and $[1,2,3,6\text{-}^{13}\text{C}_4]$ citrate were synthesized as described

previously (9, 15). The derivatization agent *N*-methyl-*N*-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide was supplied by Regis Chemical (Morton Grove, IL). All aqueous solutions were made with water purified by a "Milli-Q" system (Millipore, St-Laurent, Quebec). The albumin solution [BSA, fraction V, fatty acid-poor (Bayer, Kankakee, IL): 1.2 kg in 8 liters of Krebs buffer without glucose] was dialyzed at 4°C against 25 liters of the same buffer for 8 h. The buffer was changed six times (for a total of 150 liters of Krebs in 48 h) to reduce the background citrate concentration to the low micromolar range ($1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$). The dialyzed solution was stored at -80°C at a final concentration of 13.4%. A 20 mM solution of sodium oleate, unlabeled or labeled, complexed to albumin was prepared by first dissolving oleic acid in a 10% molar excess of 1N NaOH and then mixing with the albumin solution in a 10:1 molar ratio.

Heart perfusions

Animal experiments were approved by the local animal care committee in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. After opening the chest and inserting a cannula in the aorta, hearts were excised and transferred to a Langendorff perfusion setup, as described previously (6, 7, 16). Briefly, the hearts of fed male Sprague-Dawley rats (180-240 g; Charles-River, St-Constant, Quebec) were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg) and then perfused retrogradely through the aorta at a constant pressure of 70 mmHg with a nonrecirculating modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing (in mM) 119 NaCl, 4.8 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃ (pH 7.4) and various additives (substrates, hormones or drugs), as indicated. The perfusate was gassed directly with 5% CO₂-95% O₂ at 37°C. For heart perfusions in the presence of albumin, the buffer contained in a stirred reservoir was pumped through a filter at a rate of 80 ml/min at the top of a jacketed glass oxygenator with a large inner surface area exposed to 5% CO₂-95% O₂. The oxygenated buffer was delivered to the heart through the aortic cannula by a pump whose rate was adjusted to keep the perfusion pressure at 70 mmHg (between 10 and 15 ml/min). Excess oxygenated buffer was returned to the buffer reservoir through an overflow outlet.

The following functional parameters were monitored continuously through instruments linked to a microcomputer: 1) coronary flow, using an electromagnetic flow probe (Model FM501; Carolina Medical Electronics, King, NC), 2) temperature, using a

thermocouple (Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, OH), and 3) contractile function (heart rate, systolic and diastolic pressures, dP/dt_{max}), using a saline-filled latex balloon inserted in the left ventricular cavity, inflated to achieve an initial end-diastolic pressure of 5 mmHg, and connected to a pressure transducer (Digi-Med Heart Performance Analyzer, Micro-Med, Louisville, KY). The hearts were allowed to beat spontaneously throughout the experiments.

Experimental design

All heart perfusion experiments included a 20-min stabilization period followed by a 30- to 90-min perfusion period (Fig. 1). Three groups of perfusion experiments were conducted. Under these conditions, we quantitated citrate release rates and documented the following parameters: 1) contractile activity (from continuous monitoring of dP/dt_{max}), an index of the energy demand, 2) ^{13}C labeling of citrate isolated from the effluent perfusate and tissue, to assess the origin of the effluent citrate, 3) ^{13}C enrichment of the acetyl (C_{4+5}) and OAA ($C_{1+2+3+6}$) moiety of effluent citrate, to probe the origin and supply of substrates for the citrate synthase reaction, 4) the release rate of ketone bodies (KB), an index of acetyl-CoA spillover from the CAC (6, 7), 5) the release rate of succinate, a CAC intermediate whose release rate is increased by oxygen deprivation (16), 6) the release of LDH, an index of cellular necrosis, and 7) tissue levels of citrate and malate, an antiporter for citrate efflux from the mitochondria (5, 14, 27).

For the addition of ^{13}C substrate(s), the unlabeled substrate(s) was replaced by the corresponding labeled substrate(s), either $[1,2-^{13}C_2]$ octanoate or $[1-^{13}C]$ oleate \pm $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate). We reported previously that plateau enrichment of effluent citrate is reached within 20 min (7). All these ^{13}C -labeled substrates are metabolized to mitochondrial citrate by different pathways: $[1-^{13}C]$ oleate and $[1,2-^{13}C_2]$ octanoate are β -oxidized to M1 and M2 isotopomers of acetyl-CoA, respectively, and $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate) are decarboxylated to M2 acetyl-CoA and carboxylated to M3 OAA.

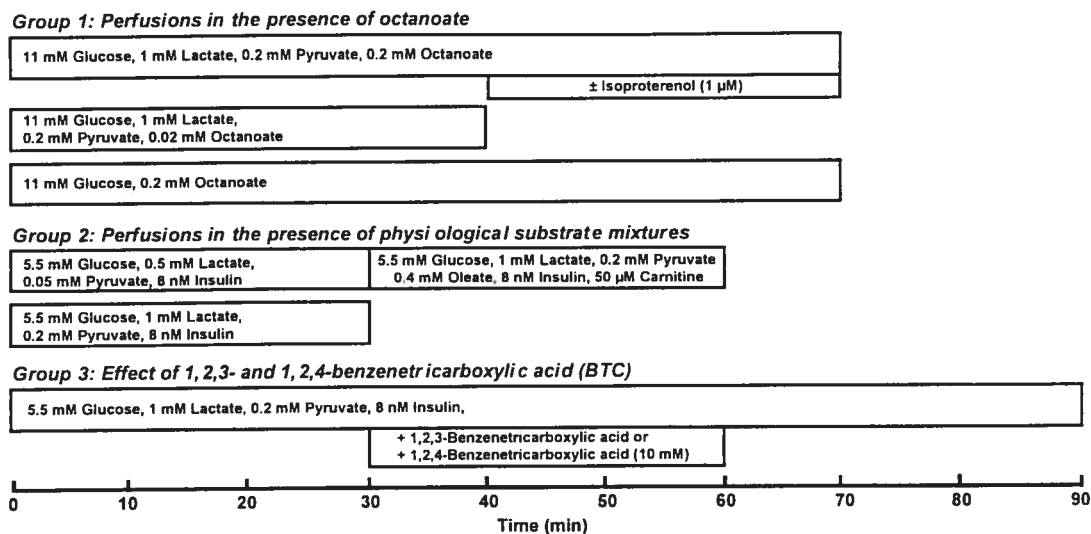


Figure 1. Experimental design (see Experimental Procedures section for details)

Hearts were perfused under normoxia for 30-90 min with a nonrecirculating modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing different substrate mixtures, as indicated. For addition of the ^{13}C -labeled substrate(s), the unlabeled substrate(s) was replaced by the corresponding labeled substrate(s), either $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ octanoate or $[1-^{13}\text{C}]$ oleate $\pm [U-^{13}\text{C}_3]$ (lactate + pyruvate). The perfusion experiments were divided into 3 groups which differed in their objectives. For all perfusion groups, the following functional parameters were monitored continuously by instruments linked to a computer: systolic and diastolic pressures, heart rate, dP/dt_{\max} , and coronary flow rates. Samples of effluent perfusates were collected on ice for determination of 1) the ^{13}C labeling pattern of citrate and 2) the release of citrate, ketone bodies (KB), succinate and lactate dehydrogenase. At the end of the experiments, the hearts were freeze-clamped for further determination of 1) tissue citrate and malate and 2) tissue molar percent enrichment (MPE) of citric acid cycle (CAC) metabolites.

Group 1: Perfusion in the presence of the medium chain fatty acid octanoate. As a follow-up to our previous work (6, 7), citrate release rates were assessed initially in isolated rat hearts perfused with 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate. Compared with this substrate mixture, referred to as the control condition, other interventions were designed to 1) accelerate the rate of citrate utilization by the CAC, by increasing energy demand with the β -adrenergic agonist isoproterenol or 2) limit its rate of synthesis by lowering the availability of substrates for the citrate synthase reaction, either acetyl-CoA or OAA. Isoproterenol was infused at a final concentration of 1 μM . Acetyl-CoA supply was reduced by decreasing exogenous octanoate concentration from 0.2 to 0.02 mM. Anaplerotic OAA supply was lowered by the removal of lactate and pyruvate from the perfusion buffer (6). Note that octanoate is a nonphysiological fatty acid whose β -oxidation is not regulated by CPT-I, and its concentration in the perfusion buffer sets the rate of acetyl-

CoA generation. At 0.2 mM, it leads to a maximal β -oxidative rate (17). The formation of acetyl-CoA in excess of citrate synthesis is reflected by a release of KB, i.e., acetoacetate and β -hydroxybutyrate (6, 7). Although the heart is normally a net consumer of KB, pseudoketogenesis can occur via reversal of the succinyl-CoA transferase reaction (10). Thus, we interpret the KB release as reflecting acetyl-CoA spillover from the CAC.

Group 2: Perfusion with physiological substrate mixtures. Further to the results obtained in the first group of perfusion experiments, we perfused hearts with substrate mixtures mimicking physiological conditions. To mimic the fed state, hearts were perfused with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, and two different concentrations of lactate and pyruvate. To mimic the fasted state, hearts were perfused in the additional presence of a LCFA, 0.4 mM oleate (complexed to 4% albumin).

Group 3: Effect of 1,2,3-BTC, an inhibitor of the mitochondrial citrate transporter. To evaluate the origin and specificity of citrate release, the effect of 1,2,3-BTC, the only known inhibitor of the mitochondrial citrate carrier, was documented and compared with its inactive chemical analog 1,2,4-BTC (5, 27). The entire perfusion protocol lasted 90 min and was divided into three 30-min periods. It was designed to document citrate release before, during, and after treatment with 10 mM 1,2,3- or 1,2,4-BTC. This concentration was chosen on the basis of other studies with intact cells (23).

Sample processing

Samples of effluent perfusate were collected on ice and processed as follows: 1) 10 ml remained untreated, and 2) 10 ml were treated with 1 M sodium borohydride (NaBH_4 ; 500 $\mu\text{l}/10$ ml) to reduce OAA to malate and acetoacetate to BHB. For the analysis of effluent citrate, samples (10 ml) were concentrated to 4 ml under a stream of air at 50°C. For the analysis of effluent citrate in albumin-containing buffer, samples of perfusate were first treated with saturated sulfosalicylic acid (250 μl) and centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. Next, after pH adjustment (between 4 and 7), the supernatants were concentrated to 4 ml and centrifuged through an Ultrafree-4 Millipore filter at 6,000 rpm for 30 min. All samples were stored at -20°C until further analysis. At the end of the perfusion experiments, the hearts were quickly freeze-clamped and stored in liquid nitrogen.

Analytical procedures

GC-MS. Methods to determine ^{13}C mass isotopomer distribution and concentrations of the following metabolites isolated from effluent perfusates or tissues have been previously described in detail (6, 7, 16): citrate ($\text{C}_{1\rightarrow 6}$) as well as its acetyl (C_{4+5}) and OAA ($\text{C}_{1+2+3+6}$) moieties, BHB, succinate, fumarate, and pyruvate. The internal standards used for quantification of succinate, BHB, and citrate release were [2,2,3,3- $^2\text{H}_4$]succinate, *RS*-[2,2,3,4,4,4- $^2\text{H}_6$]BHB and [1,2,3,6- $^{13}\text{C}_4$]- or [2,2,4,4- $^2\text{H}_4$]citrate, respectively.

All metabolites were analyzed as their *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivatives on a Hewlett Packard 5890 Series II *plus* gas chromatograph coupled to a 5972 mass selective detector equipped with an HP-5 fused silica capillary column (50 m, 0.2-mm inner diameter, 0.33- μm film thickness). The mass spectrometer was operated in the electron impact mode (70 eV) after automatic and manual calibration (to improve sensitivity in the high mass range). The split injection ratio was $\sim 10/1$, the carrier gas used was helium (0.6-0.7 ml/min), and the injection port was at 280°C. The transfer line to the mass spectrometer was at 300°C. Appropriate ion sets were monitored with a dwell time of 45-75 ms/ion. The GC temperature program, elution times, and ions monitored for analysis of the ^{13}C mass isotopomer distribution of CAC metabolites have been reported previously (6, 7, 16). Although the [$^2\text{H}_4$]citrate internal standard is a M4 citrate isotopomer, its major ion is at mass-to-charge ratio 462, corresponding to a M3 isotopomer due to the loss of water in the fragmentation process.

Other assays. The concentrations of tissue citrate and malate were determined using standard enzymatic assays (2) on a Roche Cobas Fara spectrophotometer. LDH release was assessed as described previously (3). Analyses of total and ionized calcium levels in perfusion buffer samples were conducted by the Clinical Biochemistry Laboratory of Notre-Dame Hospital.

Calculations

^{13}C labeling of metabolites. The absolute molar percent enrichment (MPE) of individual ^{13}C -labeled mass isotopomers (M_i) of a given metabolite was calculated as follows:

$$\text{MPE } (M_i) = \% A_{M_i} / [A_M + \sum A_{M_i}] \quad (1)$$

where A_M and A_{M_i} represent the peak areas, corrected for natural abundance, corresponding to the unlabeled (M) and ^{13}C -labeled (M_i) mass isotopomers, respectively.

Release rates of metabolites. Calculations of the concentration of a metabolite, using the corresponding heavy labeled internal standard, have been described previously (16). Total release rates of the metabolites were obtained by multiplying their perfusate concentrations (nmol/ml) by the coronary flow rate (ml/min). For all metabolites (citrate, KB, or succinate), a solution of Krebs buffer containing the internal standards was always processed and analyzed in parallel to correct for the background signal.

Flux parameters. The development of equations to calculate the relative contributions of octanoate and pyruvate to citrate formation, from the ^{13}C labeling pattern of citrate released by hearts perfused with $[1-^{13}\text{C}]$ octanoate or $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ (pyruvate + lactate), have been described in detail previously (7). In the present study, we report the following flux ratios: 1) the contribution of octanoate or oleate to the acetyl moiety of citrate; 2) the contribution of pyruvate to the acetyl and OAA moieties of citrate, and 3) the contribution of the unlabeled pyruvate arising from glucose or glycogen to tissue pyruvate. With $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ octanoate as the only labeled substrate, we measured the mole fraction (MF) in M_2 of the acetyl moiety of citrate [instead of the MF in M_1 for $[1-^{13}\text{C}]$ octanoate, as in our previous study (6)]. The MF in a given mass isotopomer (M_i) of a metabolite is equivalent to $\text{MPE}/100$. Then, the equation to calculate the flux ratio [(octanoate oxidation)/(citrate synthesis)] becomes

$$\text{FC}_{\text{OCT} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})} = 4 \times \text{AC}_{M_2}^{\text{CIT}} / \text{OCT}_{M_2} \quad (2)$$

where $\text{FC}_{\text{OCT} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})}$ is the fractional contribution (FC) of OCT to the acetyl moiety of citrate (AC^{CIT}) through β -oxidation, and OCT_{M_2} is the MF in M_2 of intracellular octanoate, which we assumed is equal to extracellular octanoate, since octanoate is not a physiological fatty acid. Factor 4 takes into account that octanoate is oxidized to 4 acetyl-CoA, only one of which is labeled. Using the same principle, with $[1-^{13}\text{C}]$ oleate as the labeled fatty acid, the FC of oleate (OLE) to the acetyl moiety of citrate (AC^{CIT}) through β -oxidation may be calculated using this similar equation:

$$FC_{OLE \rightarrow AC(CIT)} = 9 \times AC_{M1}^{CIT} / OLE_{iM1} \quad (3)$$

The MF in M1 of intracellular oleate (OLE_{iM1}) was assumed to be equal to extracellular oleate. Because oleate is a physiological fatty acid, its enrichment could be diluted in the cell. Thus, the calculated flux ratio represents a minimal estimate of the actual flux ratio.

Statistical analysis

Individual enrichments are averages of two to five GC-MS injections. The data are expressed as means \pm S.E. of n heart perfusions. The following tests were applied for statistical evaluation of the data: paired or unpaired t -test, one-way ANOVA followed by a Bonferroni multiple comparison post-test, one-way ANOVA for repeated measures followed by a Dunnett multiple comparison test, linear regression analysis, or Spearman's correlation. A probability of $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Origin and Magnitude of Citrate Release by Perfused Rat Hearts

Isolated rat hearts perfused under normoxia released citrate into the effluent perfusate under all conditions examined. The measured citrate release rates varied between 2 to 21 nmol/min, depending on the nature of the substrate mixture supplied to the heart, but remained constant under a given perfusion condition for up to 90 min. Such release rates represent at most 1% of the total CAC flux rate (estimated at $2.0 \pm 0.3 \mu\text{mol/min}$ in the Langendorff-perfused rat heart; see Ref. 7). Citrate release rates were highest in hearts perfused with a mixture of substrates feeding both acetyl-CoA (fatty acid) and anaplerotic OAA (lactate and pyruvate) to the citrate synthase reaction (see sections on *Modulation of Citrate Release* for details). They were lowest, but still measurable with precision, when the hearts were perfused with 11 mM glucose alone ($2.4 \pm 0.5 \text{ nmol/min}$, $n = 4$). As shown in Figure 2, the ^{13}C mass isotopomer distribution of citrate isolated from the effluent reflected that of tissue citrate. The ^{13}C substrates used in this study are known to label citrate through the mitochondrial citrate synthase reaction, after their conversion to acetyl-CoA (M1

or M2 isotopomers) and/or anaplerotic OAA (M3 isotopomers). Therefore, we concluded that effluent citrate is likely to be of mitochondrial origin. The results presented below demonstrate the modulation of citrate release by substrate supply and provide evidence for the specificity of the process.

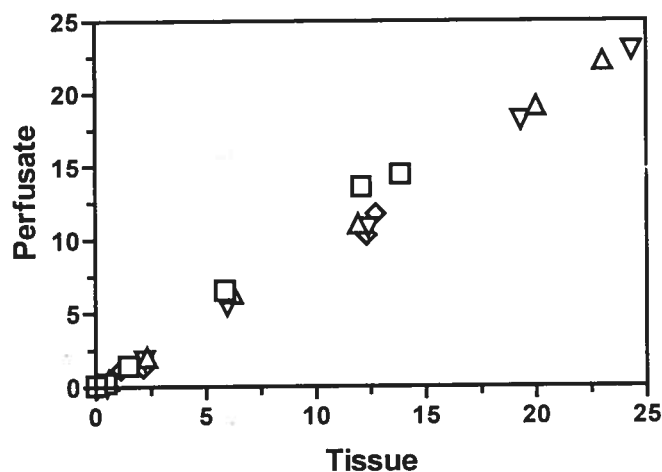


Figure 2. Correlation between the mass isotopomer distribution of tissue and effluent citrate labeled from various ^{13}C precursors of acetyl-CoA and oxaloacetate (OAA)

Hearts were perfused for 40-70 min under normoxia with various substrate mixtures as follows: either 1) 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.2 mM $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ octanoate, and 1 μM isoproterenol (Δ , $n = 5$), 2) 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.02 mM $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ octanoate (\diamond , $n = 8$), 3) 11 mM glucose, and 0.2 mM $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ octanoate (∇ , $n = 8$), or 4) 5.5 mM glucose, 1 mM $[U-^{13}\text{C}_3]$ lactate, 0.2 mM $[U-^{13}\text{C}_3]$ pyruvate, and 0.4 mM $[1-^{13}\text{C}]$ oleate (\square , $n=6$). MPE of the individual ^{13}C -labeled M1, M2 and M3 isotopomers of citrate, isolated from the effluent perfusate and freeze-clamped tissue, was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Data are means \pm S.E. of n heart perfusion experiments. Linear regression analysis: slope = 0.95 ± 0.05 ; $r = 0.99$, $P < 0.05$. Error bars are included in the symbols.

Modulation of Citrate Release: Experiments with Octanoate (Group 1)

Functional status. Hearts perfused under normoxia for up to 70 min with 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate (control condition) maintained constant spontaneous beating at 280 ± 4 beats/min, a coronary flow rate of 10.4 ± 0.3 ml/min, a rate pressure product of $(23.6 \pm 0.7) \times 10^3$ mmHg x beats/min, and a contractile activity (dP/dt_{max}) of $2,379 \pm 121$ mmHg/s (data not shown). The contractile activity of the heart was not modified significantly by lowering the exogenous octanoate concentration from 0.2 to 0.02 mM or by removing lactate and pyruvate. However, it was increased significantly by the

infusion of 1 μM isoproterenol to $146 \pm 13\%$ of the control value ($P < 0.05$, $n = 5$; paired t -test). Thus, from the contractile activity of the heart, which is the main determinant of its energy demand, we concluded that the rate of citrate utilization by the CAC was similar under all conditions, except with isoproterenol with which it was augmented.

Metabolic status: availability and source of substrates for citrate synthesis. Let us examine how the availability of the two substrates for the citrate synthase reaction varied under the various perfusion conditions of Group 1. Although the availability of anaplerotic OAA for citrate synthesis was not assessed directly in this group of perfusions, we predicted from previous studies (6, 7) that removal of lactate plus pyruvate from the buffer would lower the supply of anaplerotic OAA. The availability and sources of acetyl-CoA for citrate synthesis are inferred from 1) the flux ratio (octanoate oxidation/citrate synthesis) evaluated from the M2 enrichment values of the C_{4+5} of effluent citrate using Eq. 2 (Figure 3A, see Footnote) and 2) the KB release rates (Figure 3B). The observed variations in these two parameters are compatible with the known metabolism of octanoate. Indeed, since octanoate β -oxidation is not regulated at CPT-I, its concentration in the perfusion buffer sets the rate of acetyl-CoA generation. Accordingly, whenever octanoate was supplied at 0.2 mM, a concentration leading to maximal β -oxidative rates (17), the acetyl-CoA of citrate was predominantly supplied by octanoate β -oxidation [$>80\%$ as indicated by the flux ratios (octanoate oxidation/citrate synthesis); Figure 3A] at a rate exceeding citrate synthesis (as indicated by KB release; Figure 3B). Note that, under control conditions, the KB release rate represents as much as 25% of the rate of 1) octanoate uptake or 2) acetyl-CoA oxidation in the CAC (6). When octanoate was supplied at 0.02 mM, only 30% of the acetyl-CoA of citrate arose from β -oxidation, and the KB release rate was close to the detection level, in agreement with a decreased supply of acetyl-CoA.

Citrate release and tissue levels of citrate and malate. Hearts perfused under control conditions for 70 min released citrate at a constant rate of 21 ± 1 nmol/min (Figure 3C). This rate was decreased significantly by 1) accelerating citrate utilization by the CAC through the addition of 1 μM isoproterenol or by 2) limiting the supply of substrates for citrate synthesis, either acetyl-CoA, by the lowering of exogenous

octanoate concentration from 0.2 to 0.02 mM, or anaplerotic OAA, by the removal of exogenous lactate and pyruvate. The similar decrease in citrate release rates under conditions where the delivery of either acetyl-CoA or OAA was limited emphasizes the requirement of both substrates for the synthesis of excess citrate relative to the CAC flux. It is noteworthy that, although the citrate release rate was decreased under limited OAA supply, the KB release rate was increased, suggesting a greater acetyl-CoA spillover from the CAC.

Comparison of Figure 3, C and D, reveals that citrate release rates varied in parallel with tissue levels of citrate plus malate, the antiporter for the mitochondrial tricarboxylate transporter. Note the closer relationship between citrate release rates and tissue levels of citrate plus malate than with tissue citrate alone.

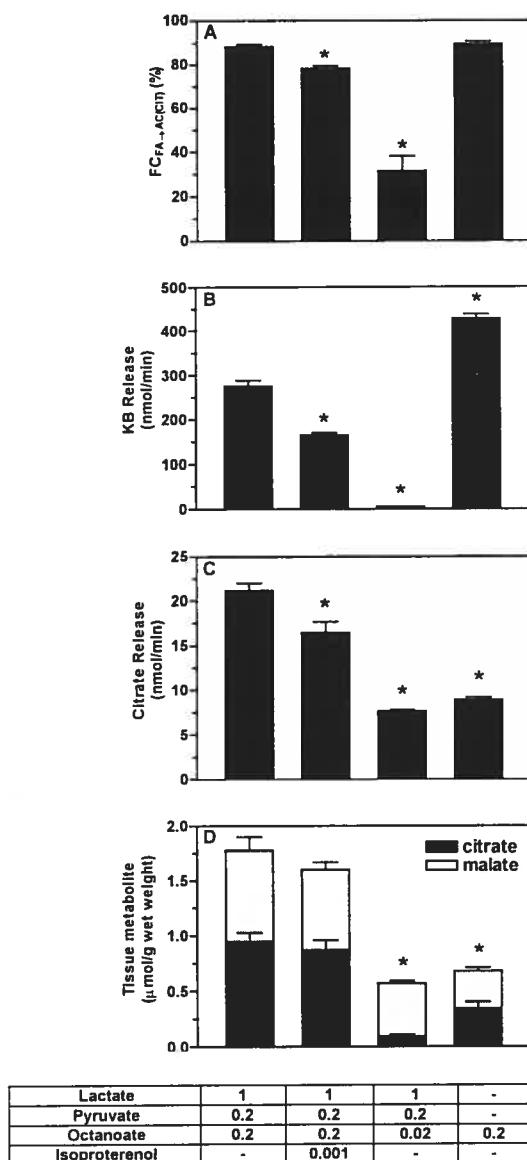


Figure 3. Metabolic status of hearts perfused in the presence of the medium-chain fatty acid (MCFA) octanoate

Data are from heart perfusion experiments depicted in Figure 1 as Group 1. Hearts were perfused under normoxia with 11 mM glucose and other additives at mM concentrations as indicated. After a 20-min stabilization period, unlabeled octanoate was replaced by [1,2-¹³C₂]octanoate, and the perfusion continued for 40 or 70 min before freeze clamping of the heart. The following parameters were documented. **A:** flux ratio [(octanoate oxidation)/(citrate synthesis)] ($FC_{OCT \rightarrow AC(CIT)}$). This ratio was calculated by introducing in Eq. 2 the M2 enrichment values of the C₄₊₅ of effluent citrate determined at plateau enrichment (n = 4-8). **B and C:** KB and citrate release rates, respectively. Samples of coronary effluent perfusate were collected at various times and processed for the determination of KB and citrate concentration by GC-MS. The release rate values represent those measured throughout the perfusion experiment for all conditions, except with isoproterenol where they represent the 60- to 70-min time period (n = 5-9). **D:** tissue concentration of citrate (solid bars) and malate (open bars). Freeze-clamped hearts were homogenized and processed for the determination of metabolites using standard enzymatic methods (n = 5-9). Note that the factor for conversion of measured g wet wt to g dry wt was determined to be 8.85 ± 0.16 (n = 29). All data are means \pm S.E. * $P < 0.05$, isoproterenol vs. control; paired *t*-test. All other conditions vs. control; one-way ANOVA followed by a Bonferroni multiple comparison test.

Modulation of Citrate Release: Experiments with Physiological Substrate Mixtures (Group 2)

In addition to the results from the first group of perfusion experiments, we documented citrate release in hearts perfused with substrate mixtures mimicking the physiological state, either the fed (5.5 mM glucose, 0.5 or 1 mM lactate, 0.05 or 0.2 mM pyruvate, and 8 nM insulin) or the fasted state (5.5 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 8 nM insulin and 0.4 mM LCFA oleate).

Functional status. Hearts perfused under normoxia with 5.5 mM glucose, 0.5 or 1 mM lactate, 0.05 or 0.2 mM pyruvate, and 8 nM insulin maintained contractile activity (dP/dt_{max}) of $3,264 \pm 95$ mmHg/s. In the presence of oleate, dP/dt_{max} values were $2,256 \pm 164$ mmHg/s ($n = 6$; $P < 0.05$ with vs. without oleate).

Citrate release. Hearts perfused with 5.5 mM glucose, 0.5 mM lactate, 0.05 mM pyruvate, and 8 nM insulin released citrate at a rate of 6.0 ± 0.6 nmol/min (Figure 4). This release rate was increased significantly by 1) raising the concentrations of lactate plus pyruvate to 1 mM and 0.2 mM, respectively, and by 2) adding the LCFA oleate (0.4 mM). It is noteworthy that the citrate release rates measured in the presence of LCFA oleate were not significantly different from those measured with the MCFA octanoate.

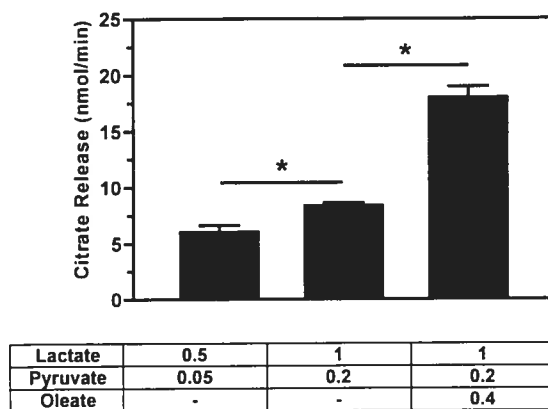


Figure 4. Citrate release rates by hearts perfused with physiological substrate mixtures

Data are from heart perfusion experiments depicted in Figure 1 as Group 2. Hearts were perfused under normoxia with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, and other substrates at mM concentrations, as indicated. Samples of effluent perfusate were collected on ice and processed for the determination of citrate concentrations by GC-MS. Data are means \pm SE of 6-16 heart perfusion experiments. * $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by a Bonferroni multiple comparison test.

Metabolic status: availability and source of substrates for citrate synthesis. In an attempt to explain the similar citrate release rates in hearts perfused with octanoate and oleate, we determined the relative contribution of pyruvate and oleate to the formation of acetyl-CoA and anaplerotic OAA. This was done by perfusing hearts with a mixture of ^{13}C -labeled substrates (0.4 mM [$1\text{-}^{13}\text{C}$]oleate, 1 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]lactate and 0.2 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate) and determining the ^{13}C labeling of effluent citrate and of tissue pyruvate, succinate, and fumarate, as described previously (6, 7). Note that KB release by hearts perfused with oleate was low (15.5 ± 1.7 nmol/min, $n = 6$, not shown), in agreement with a regulated β -oxidation rate (22).

As shown in Table 1, tissue pyruvate was only enriched in M3 isotopomers, suggesting a negligible decarboxylation of malate to pyruvate through the malic enzyme reaction. Tissue citrate was enriched in M1, M2, and M3 isotopomers. Enrichment in isotopomers of higher masses was $<1.5\%$, indicating that the proportion of citrate molecules labeled in both the acetyl and OAA moieties was small. The labeling pattern of citrate is compatible with the formation of M1 and M2 acetyl-CoA from oleate β -oxidation and pyruvate decarboxylation, respectively, and of M3 OAA from pyruvate carboxylation. Isotope dilution between tissue citrate and succinate was evaluated at 1.1 ± 0.2 (Eq. 10 of Ref. 7). Tissue succinate and

fumarate showed similar enrichment in M1 and M2 isotopomers, while tissue fumarate was more enriched in M3 isotopomers. This can be explained by the entry of M3 isotopomers at the level of malate and/or OAA by anaplerotic carboxylation of [U-¹³C₃]pyruvate.

Table 1. ¹³C labeling of metabolites resulting from [1-¹³C]oleate, [U-¹³C₃]lactate, and [U-¹³C₃]pyruvate

| Metabolites | MPE | | |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | M1 | M2 | M3 |
| Pyruvate | ND | ND | 77.9 ± 5.1 |
| OAA (citrate) | 9.35 ± 0.80 | 6.95 ± 0.51 | 2.96 ± 0.26 |
| Acetyl-CoA (citrate) | 8.88 ± 0.85 | 7.50 ± 0.96 | NA |
| Citrate | 14.5 ± 0.5 | 13.5 ± 0.5 | 6.34 ± 0.23 |
| Succinate | 15.2 ± 1.0 | 10.1 ± 1.4 | 2.92 ± 0.87 |
| Fumarate | 15.3 ± 0.6 | 10.4 ± 1.1 | 5.14 ± 0.66 |

Data, expressed as molar percent enrichment (MPE), are the means ± SE of 6 heart perfusion experiments. For all metabolites, the MPE in M4 to M6 isotopomers was below 1.5% (data not shown). Data are from heart perfusion experiments with 5.5 mM glucose, 1mM [U-¹³C₃]lactate, 0.2 mM [U-¹³C₃]pyruvate, 0.4 mM [1-¹³C]oleate-4% albumin, 50 μM carnitine, and 8 nM insulin (Group 2 in Figure 1). Effluent perfusates (citrate) and freeze-clamped hearts (pyruvate, succinate and, fumarate) were processed for analysis of the ¹³C labeling of metabolites by GC-MS. ND, not detected; NA, not applicable. OAA, oxaloacetate.

The isotopic data in Table 1 allows the calculation of several flux ratios. From the MPE of tissue pyruvate in M3 isotopomers, we conclude that pyruvate converted to acetyl-CoA or OAA arose predominantly from exogenously supplied pyruvate and/or lactate (0.76 ± 0.06 from $FC_{PYRe \rightarrow PYRi}$; Eq. 2 of Ref. 7); the remaining ($1 - FC_{PYRe \rightarrow PYRi} = 0.24 \pm 0.06$) arose from glucose and/or glycogen. These data are in agreement with other studies conducted *in vivo* (35) and *ex vivo* in the perfused rat heart (4) showing a preferential oxidation of exogenous lactate and/or pyruvate relative to glucose. Other flux ratios are shown in Table 2. The acetyl moiety of citrate was predominantly supplied by oleate β-oxidation [$80 \pm 8\%$ from the flux ratio (oleate oxidation/citrate synthesis); Eq. 3]. The contribution of pyruvate decarboxylation to the acetyl moiety of citrate was substantial ($11 \pm 3\%$; Eq. 5 of Ref. 7) and was greater than that of pyruvate carboxylation to the OAA moiety of citrate ($2.4 \pm 0.2\%$; Eq. 4 of Ref. 7). Note that, because the formation of M3 OAA through

the metabolism of citrate isotopomers in the CAC was low ($31.9 \pm 2.2\%$; Eqs. 8 and 9 of Ref. 7), we obtained good precision on flux measurements (as indicated by the SE) of anaplerotic pyruvate carboxylation despite substantial pyruvate decarboxylation.

Table 2. Flux parameters determined in hearts perfused with [1- ^{13}C]oleate, [U- $^{13}\text{C}_3$]lactate, and [U- $^{13}\text{C}_3$]pyruvate

| Flux Parameters | |
|---|-------------------|
| $\text{FC}_{\text{oleate} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})}$: Oleate oxidation/CS | 0.80 ± 0.08 |
| $\text{FC}_{\text{PYRI} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})}$: PDC/CS | 0.11 ± 0.03 |
| $\text{FC}_{\text{PYRI} \rightarrow \text{OAA}(\text{CIT})}$: PC/CS | 0.024 ± 0.002 |
| PC/PDC | 0.25 ± 0.03 |

Data are the means \pm SE of 6 heart perfusion experiments. Data are from heart perfusion experiments with 5.5 mM glucose, 1mM [U- $^{13}\text{C}_3$]lactate, 0.2 mM [U- $^{13}\text{C}_3$]pyruvate, 0.4 mM [1- ^{13}C]oleate-4% albumin, 50 μM carnitine, and 8 nM insulin (Group 2 in Figure 1). Flux ratio for oleate oxidation/citrate synthesis [$\text{FC}_{\text{oleate} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})}$] was calculated from the M1 enrichment value of the C_{4+5} of effluent citrate (AC^{CIT}) determined at plateau (50-60 min). Flux ratios pyruvate decarboxylation/citrate synthesis [$\text{FC}_{\text{PYRI} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})}$: PDC/CS] and pyruvate carboxylation/citrate synthesis [$\text{FC}_{\text{PYRI} \rightarrow \text{OAA}(\text{CIT})}$: PC/CS] were calculated from the M3 MPE of tissue pyruvate, and the M2 MPE of the C_{4+5} , or the corrected M3 MPE of the $\text{C}_{1+2+3+6}$ (OAA^{CIT}) of effluent citrate (50-60 min), as described previously (6, 7).

Specificity of Citrate Release (Groups 1-3)

Effect of 1,2,3- and 1,2,4-BTC (Group 3). *Functional status* (data not shown). The addition of 10 mM 1,2,3-BTC or 1,2,4-BTC to hearts perfused with 5.5 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 8 nM insulin, resulted in a similar decrease in dP/dt_{max} values from $3,203 \pm 122$ to $2,099 \pm 190$ mmHg/sec ($P < 0.05$, $n = 4$; one-way ANOVA for repeated measures followed by a Dunnett multiple comparison test). Upon removal of these agents, dP/dt_{max} returned within 10 min to initial values, indicating a reversible effect ($P < 0.05$). Both agents also had a reversible influence on coronary flow rates (a decrease from 10.2 to 8.2 ml/min, $P < 0.05$, $n = 8$). These effects of 1,2,3-BTC and 1,2,4-BTC may be explained by calcium chelation. Indeed, the addition of these two agents to the perfusion buffer lowered the concentration of ionized calcium from 0.94 ± 0.01 to 0.59 ± 0.07 mM ($P < 0.05$, $n = 4$; unpaired t -test), whereas the total calcium concentration was similar at 1.25 ± 0.02 mM ($n = 4$).

Citrate release. In contrast to their similar effects on contractile activity, there was a differential effect of 1,2,3-BTC and 1,2,4-BTC on citrate release, in agreement with the participation of the mitochondrial tricarboxylate transporter. Indeed, the addition of 10 mM 1,2,3-BTC but not 1,2,4-BTC resulted in a significant reversible 25% decrease of the citrate release rate (Fig. 5).

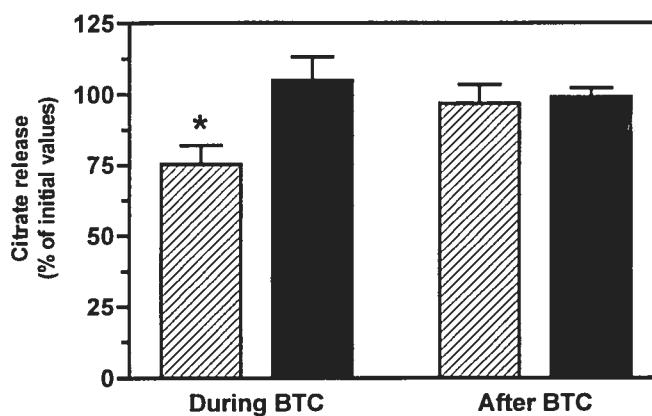


Figure 5. Effect of 10 mM 1,2,3-benzenetricarboxylic acid (BTC; hatched bars) and 1,2,4-BTC (filled bars) on citrate release rates

Data are from heart perfusion experiments depicted in Fig. 1 as *group 3*. Hearts were perfused under normoxia with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM lactate, and 0.2 mM pyruvate. Samples of coronary effluent perfusate were collected on ice and processed for the determination of citrate concentrations by GC-MS. Citrate release rate values, assessed during the last 5 min of each 30-min time period, are expressed in percentage (%) of those measured before the addition of 1,2,3- or 1,2,4-BTC. The data are means \pm SE of 4 heart perfusion experiments. * $P < 0.05$: One-way ANOVA for repeated measures followed by the Dunnett multiple comparison test.

LDH release (Groups 1-3; data not shown). Under all conditions examined, LDH release rates were 20- to 50-fold lower than those measured in hearts reperfused after 90 min of low-flow ischemia or 40 min of hypoxia (3, 16). Furthermore, the LDH release rates did not correlate with the citrate release rates ($r = -0.1$, $P = 0.95$, not significant). A significant increase in LDH release was observed during isoproterenol infusion (from 18 ± 2 to 62 ± 14 mU/min, $P < 0.05$, $n = 4$; paired *t*-test). Similarly, LDH release was increased upon removal of 1,2,3-BTC (from 19 ± 9 to 74 ± 20 mU/min, $P < 0.05$, $n = 4$; one-way ANOVA for repeated measures followed by a Dunnett multiple comparison test) but not of 1,2,4-BTC, thus raising the possibility of a detrimental effect associated with the inhibition of citrate transport from the mitochondria to the cytosol.

Succinate release (Groups 1–3, data not shown). Under all conditions, succinate release remained between 2 and 20 nmol/min, which is three- to sixfold lower than rates reported for oxygen-deprived hearts (16). There was no correlation between citrate and succinate release rates ($r = 0.48$, $P = 0.2$), indicating that these two cataplerotic reactions are regulated independently.

DISCUSSION

Results from this study demonstrate that citrate release by rat hearts perfused *ex vivo* under normoxia is specifically modulated by various perfusion interventions. The specificity of this process is also supported by the lack of correlation between the release rates of citrate and those of LDH, an index of cellular membrane damage, or of succinate, another CAC intermediate whose release increases with oxygen deprivation (16). Furthermore, 1) the identical ^{13}C labeling of tissue and effluent citrate resulting from ^{13}C -labeled substrates feeding acetyl-CoA and OAA to the mitochondrial citrate synthase reaction and 2) a modulation of citrate release rates by the nature and concentrations of these substrates indicate that citrate release reflects mitochondrial citrate cataplerosis. Altogether, the results from the present study provide a basis for discussing the following aspects relevant to mitochondrial cataplerosis: 1) the participation of the tricarboxylate transporter relative to other transporters, 2) its modulation by metabolic conditions, and 3) its link to the regulatory role of cytosolic citrate. A schematized overview of the metabolic processes relevant to this discussion is presented in Figure 6.

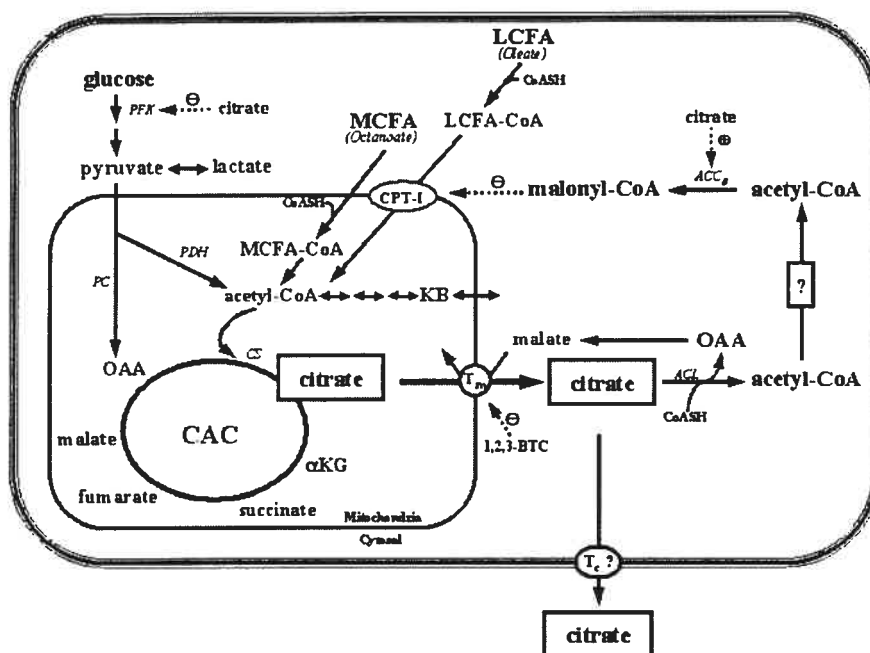


Figure 6. Schematic overview of metabolic processes and factors relevant to mitochondrial citrate cataplerosis in the heart (see Discussion)

ACL, ATP citrate lyase; CS, citrate synthase; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; T_m , mitochondrial tricarboxylate transporter; T_c , cell membrane citrate transporter; α KG, α -ketoglutarate; PFK, phosphofruktokinase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; CPT-I, carnitine palmitoyltransferase-I; +, activation; -, inhibition.

In the heart, the existence of mitochondrial citrate cataplerosis has often been questioned because of the low activity of the mitochondrial tricarboxylate transporter. The activity of this transporter may be low when compared to lipogenic tissue such as the liver. Still this low activity is compatible with the 1) citrate release rates reported in the present study and 2) a role of cytosolic citrate as a "signaling molecule" in nonlipogenic tissues (28). The participation of this transporter in mitochondrial citrate cataplerosis in the intact heart is substantiated by the following results from our investigation. First, citrate release by the heart was inhibited by 1,2,3-BTC, the only known specific inhibitor of the mitochondrial tricarboxylate transporter, but not by 1,2,4-BTC, the inactive chemical analogue. Second, citrate release rates varied in parallel with the tissue levels of citrate plus malate, the antiporter. A closer relationship between citrate release rates and tissue levels of citrate plus malate than with tissue citrate supports the suggestion of Ruderman et al. (28) that cytosolic citrate would be reflected more closely in the sum of whole cell concentration of citrate plus malate than citrate alone. Our data indicate that the

tissue ratio citrate/malate varies with the availability and/or source of acetyl-CoA for citrate synthesis. Indeed, this ratio was close to 1 for hearts perfused with 0.2 mM octanoate, but only 1/5 for hearts perfused with 0.02 mM octanoate.

Regarding the relatively low inhibition of citrate release (25%) by 1,2,3-BTC, there is a possibility that, due to steric hindrance, 1,2,3-BTC does not easily reach the extra-mitochondrial space. Thus a greater concentration of exogenous 1,2,3-BTC would be necessary for maximal inhibition of the mitochondrial transporter. In guinea pig heart mitochondria, 50 mM 1,2,3-BTC achieved maximal inhibition of the activity of the transporter (27), whereas, in rat heart mitochondria, the same concentration resulted in only 25% inhibition (5). We did not attempt to use such a high concentration of 1,2,3-BTC or 1,2,4-BTC in the intact beating heart since a decrease in contractile function, possibly due to calcium chelation, was already observed at a concentration of 10 mM. An alternative explanation for the low inhibition by 1,2,3-BTC would be the participation of the following additional mechanisms for the transfer of citrate from the mitochondria to the cytosol (13): the conversion of citrate to α -ketoglutarate in the mitochondria through normal operation of the CAC, followed by the transport of α -ketoglutarate from the mitochondria to the cytosol by the dicarboxylate transporter, and the conversion of α -ketoglutarate to citrate by reversal of the cytosolic NADP-linked isocitrate dehydrogenase (ICDH) reaction. In the heart, the activity of the mitochondrial dicarboxylate transporter is several-fold higher than that of the tricarboxylate transporter (12). Although the occurrence of this alternative pathway was not tested specifically in the present study, the following data from previous heart perfusion experiments with [U- $^{13}\text{C}_5$]glutamate suggest that it is unlikely to be involved (6). Under normoxia, the maximal contribution of reversal of the NADP-ICDH reaction to citrate formation was evaluated at most at 5%, the remaining 95% being formed through the citrate synthase reaction. Because the activity of cytosolic NADP-ICDH is at most 2% of total ICDH activity (25), this sets its maximal contribution at 0.1% of the CAC, which is 20-fold lower than the citrate release rate, i.e., 2 % of the CAC.

Therefore, based on the above considerations, it is likely that the mitochondrial tricarboxylate transporter participates in the transfer of citrate from the mitochondria to the cytosol, under our conditions. Besides, our observation of increased LDH

release associated with the addition of 1,2,3-BTC, but not 1,2,4-BTC, suggests that the activity of this transporter, and thus mitochondrial citrate cataplerosis, could be important for the integrity of myocardial cells. At present, we do not have an explanation for this unexpected finding. Mitochondrial transmembrane carrier deficiencies have recently been considered as potential causes of mitochondriopathies (12). It is proposed that defects in these carriers may induce imperfect energy metabolism, probably as a result of osmotic disturbances within the mitochondria. So far, little is known about the heart mitochondrial citrate transporter aside from its mRNA expression in the heart (12). This subject is, however, beyond the scope of the present study.

What then triggers mitochondrial citrate cataplerosis in the heart? How does cardiac mitochondrial citrate cataplerosis integrate itself with a role of cytosolic citrate as a signaling molecule? Before attempting to answer these questions, let us first summarize the proposed role of cytosolic citrate in fuel signaling in nonlipogenic tissues, such as the heart (28). Cytosolic citrate would act as a signal to the cell that it has an excess of fuel for its immediate needs. Thus an increase of cytosolic citrate could restrain the use of both fatty acid (via malonyl-CoA CPT-I inhibition) and glucose (via inhibition of PFK) for energy production. In the heart, the regulatory role of cytosolic citrate on glycolysis was first proposed in 1963 by Garland *et al.* (11) who reported a correlation between citrate tissue levels and PFK activity. As for a link between cytosolic citrate and malonyl-CoA synthesis, it remains to be clarified. Malonyl-CoA is synthesized from acetyl-CoA by acetyl-CoA carboxylase (ACC). In skeletal muscle, experimental evidence supports a role for cytosolic citrate both as 1) a precursor of acetyl-CoA, after citrate cleavage by the ATP citrate lyase, and 2) an allosteric activator of ACC (28). However, the kinetic and regulatory properties of the cardiac ACC, predominantly the ACC_β isoform, are such that its activity appears to depend more on the acetyl-CoA supply than on citrate activation (19, 29). Therefore, could cytosolic citrate be a precursor of malonyl-CoA in the heart? To the best of our knowledge, this possibility has not been examined. The activity of the cytosolic ATP citrate lyase in the heart is low [0.2 μmol/min x g wet wt (1)], but probably sufficient to maintain the very small pool of malonyl-CoA [nmol/g wet wt (1, 19, 21)].

In light of the above considerations, let us now examine how our data on citrate release rates, reflecting mitochondrial cataplerosis, are in agreement with the proposed regulatory role of cytosolic citrate. Our series of heart perfusions with the MCFA octanoate indicate that citrate release rates are modulated by 1) the energy demand of the heart and 2) the availability of substrates for the citrate synthase reaction. Although the effect of energy demand should be substantiated by studies on the working rat heart perfused at different workloads, these data support a role for cytosolic citrate as a signal to the cell that the fuels available are in excess for its immediate needs. For hearts perfused with octanoate and physiological concentrations of lactate and pyruvate, we proposed previously that the high production of mitochondrial acetyl-CoA and NADH from octanoate β -oxidation, which results in *state 4* respiration (18), inhibits pyruvate decarboxylation and favors anaplerotic pyruvate carboxylation (6, 7). This sets up conditions for citrate accumulation and efflux from the mitochondria to the cytosol. We emphasized that a surge of anaplerotic pyruvate carboxylation was required to balance the cataplerotic efflux of citrate. In view of the proposed regulatory role of cytosolic citrate, such a link between pyruvate anaplerosis and citrate cataplerosis would support a role for these reactions in metabolic signaling in the heart.

However, other factors appear to contribute to the high rate of citrate release by hearts perfused with glucose, lactate, pyruvate, and the LCFA oleate. Indeed, under these conditions, the relative substrate flux through pyruvate carboxylation and decarboxylation differs markedly from that measured in hearts perfused with glucose, lactate, pyruvate, and the MCFA octanoate (from the flux ratio pyruvate carboxylation/pyruvate decarboxylation reported in Table 2 and Ref. 6: 0.25 ± 0.03 vs 2.8 ± 0.7 , respectively). We can only speculate on the nature of the other factor(s) involved. We exclude 1) a difference in the rate of citrate utilization by the CAC, since hearts perfused with octanoate and oleate showed similar dP/dt_{\max} values and 2) the participation of another anaplerotic reaction aside from pyruvate carboxylation, for example, at the level of α -ketoglutarate or succinate, since there is little tracer dilution between tissue citrate and succinate. However, there is a possibility that citrate release in the effluent underestimates mitochondrial citrate cataplerosis because of 1) citrate metabolism in the cytosol by the ATP citrate lyase and 2) the presence of a regulated transport system for citrate in the plasma membrane. Little is

known about these two processes in the heart, although a sodium-dependent transporter was characterized in tissues such as the kidney and liver (24). As for the ATP citrate lyase, a role for this enzyme in the removal of citrate from the cytosol was suggested (5) where its activity would be limited by the low level of cytosolic CoASH resulting from LCFA activation. In contrast, the activation of MCFA such as octanoate occurs in the mitochondria. Thus, in hearts perfused in the absence of LCFA, citrate release may represent a minimal estimate of mitochondrial citrate cataplerosis due to higher activity of the ATP citrate lyase.

Despite these uncertainties regarding the magnitude of mitochondrial citrate, as reflected by citrate release, the observed variations in citrate release rates in hearts perfused with the various substrate mixtures appear nevertheless compatible with a regulatory role of cytosolic citrate in glycolysis and fatty acid oxidation. Indeed, this dual role of citrate requires its presence in the cytosol under all metabolic conditions, although its concentration should be higher when glycolysis is inhibited. Accordingly, citrate release was observed under all conditions examined, even in the presence of glucose as sole substrate. Furthermore, citrate release rates were highest in hearts perfused with physiological concentrations of glucose, lactate, pyruvate, and a fatty acid, either the LCFA oleate or the MCFA octanoate. Under these conditions, we documented active β -oxidation and a low contribution of glycolysis to tissue pyruvate formation (data from Table 2 and Ref. 6). Similarly, *in vivo* studies with normal human subjects showed that myocardial citrate release correlated positively with LCFA uptake, but negatively with glucose uptake (33, 34). Interestingly, these correlations were not observed in patients with coronary artery disease, suggesting dysregulation. As for a possible link between citrate cataplerosis and malonyl-CoA, although only circumstantial, the results from heart perfusion with glucose, insulin, lactate, and pyruvate appear more compatible with a role of citrate as a precursor, rather than an activator, of malonyl-CoA formation. Indeed, under these conditions, where tissue malonyl-CoA and the glycolytic rate were expected to be greater than in hearts perfused in the additional presence of a LCFA (1, 19), citrate release rates were lower. Still, they were modulated by physiological concentrations of exogenous lactate and pyruvate.

In conclusion, the results from this study demonstrate that citrate release by rat hearts perfused *ex vivo* under normoxia is a specific process, reflecting citrate efflux from the mitochondria to the cytosol or cataplerosis. They indicate that citrate cataplerosis is modulated by energy demand and by the nature and concentrations of substrates feeding the citrate synthase reaction, either acetyl-CoA or anaplerotic OAA. These changes are in agreement with the crucial roles of citrate 1) in the mitochondria for energy production and 2) in the cytosol as a signal molecule regulating substrate fuel selection. However, under some conditions, such as in the absence of LCFA, the measured citrate release rates may underestimate the magnitude of mitochondrial citrate cataplerosis due to citrate metabolism in the cytosol by the ATP citrate lyase. The participation of this enzyme, which is essential to the role of citrate as a precursor of malonyl-CoA, remains to be demonstrated. Finally, our results indicate that mitochondrial citrate cataplerosis occurs at least in part through the tricarboxylate transporter and suggest a potential physiological significance of this transporter for the integrity of myocardial cells.

Footnote:

The acetyl moiety of effluent citrate (C_{4+5}) labeled from $[1,2-^{13}C_2]$ octanoate was enriched solely in M2 isotopomers (data not shown). M1 enrichment of the acetyl moiety was low and imprecise (not significant, when tested against the null hypothesis, not shown), indicating negligible recycling of ^{13}C label through malate \rightarrow pyruvate \rightarrow acetyl-CoA reactions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. John C. Chatham for helpful comments and Dr. Henri Brunengraber for generously supplying the dialyzed albumin solution. Thanks are also due to Ovid Da Silva of the Research Support Office, CHUM Research Center, for editing this text.

The study was supported by Medical Research Council of Canada (Grants MA-9575 and MT-10920 to C. Des Rosiers and studentship to G.Vincent).

Part of this work was presented at the Experimental Biology Meeting in New Orleans, LA, in May 1997 and in Washington, DC, in April 1999 and at the XVI World Congress of the International Society for Heart Research in Greece in May 1998.

ABBREVIATIONS

ACC: acetyl-CoA carboxylase

Ac-CoA: Acetyl-CoA

BHB: β -hydroxybutyrate

BTC: 1,2,3- or 1,2,4- benzenetricarboxylic acid

CAC: citric acid cycle

CPT-I: carnitine palmitoyl transferase I

GC-MS: gas chromatography-mass spectrometry

ICDH: isocitrate dehydrogenase

KB: ketone bodies

LCFA: long chain fatty acid

LDH: lactate dehydrogenase

MCFA: medium chain fatty acid

MID: mass isotopomer distribution

MPE: molar percent enrichment

OAA: oxaloacetate

PFK: phosphofructokinase

C_{1+2} , $C_{1\rightarrow6}$ and similar annotations refer to the carbons of a given molecule, with the number indicating the position of individual carbons or a series of carbons, respectively.

REFERENCES

1. Awan MM and Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem. J.* 295: 61-66, 1993.
2. Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. Second edition; Volume 3. Verlag Chemie International; New York; Academic Press; 1974, pp. 1562-1565 and 1585-1589.
3. Brunet J, Boily M-J, Cordeau S, and Des Rosiers C. Effects of *N*-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow. *Free Radical Biol. Med.* 19: 627-638, 1995.
4. Chatham JC, Gao Z-P, Bonen A, and Forder JA. Preferential inhibition of lactate oxidation relative to glucose oxidation in the rat following diabetes. *Cardiovasc. Res.* 43: 96-106, 1999.
5. Cheema-Dhadli S, Robinson BH, and Halperin ML. Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can. J. Biochem.* 54: 561-565, 1976.
6. Comte B, Vincent G, Bouchard B, and Des Rosiers C. A ^{13}C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 272: 26125-26131, 1997.
7. Comte B, Vincent G, Bouchard B, and Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C labeling of citrate released by perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 272: 26117-26124, 1997.
8. Depré C, Rider MH, and Hue L. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* 258: 277-290, 1998.
9. Des Rosiers C, Montgomery JA, Desrochers S, Garneau M, David F, Mamer OA, and Brunengraber H. Interference of 3-hydroxyisobutyrate with measurements of ketone body concentration and isotopic enrichment by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 173: 96-105, 1988.
10. Fink G, Desrochers S, Des Rosiers C, Garneau M, David F, Daloze T, Landau RB, and Brunengraber H. Pseudoketogenesis in the perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 263: 18036-18042, 1988.

11. Garland PB, Randle PJ, and Newsholme EA. Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature* 200: 169-170, 1963.
12. Huizing M, Ruitenbeek W, van den Heuvel LP, Dolce V, Lacobazzi V, Smeitink JAM, Palmieri F, and Trijbels JMF. Human mitochondrial transmembrane metabolite carriers: tissue distribution and its implication for mitochondrial disorders. *J. Bioenerg Biomembr* 30: 277-284, 1998.
13. Kauppinen RA, Hiltunen JK, and Hassinen IE. Compartmentation of citrate in relation to the regulation of glycolysis and the mitochondrial transmembrane proton electrochemical potential gradient in isolated perfused rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 681: 286-291, 1982.
14. LaNoue K, Nicklas WJ, and Williamson JR. Control of citric acid cycle activity in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 245: 102-111, 1970.
15. Laplante A, Comte B, and Des Rosiers C. Assay of blood and tissue oxaloacetate and α -ketoglutarate by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 224: 580-587, 1995.
16. Laplante A, Vincent G, Poirier M, and Des Rosiers C. Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A ^{13}C mass isotopomer study. *Am. J. Physiol.* 272: E74-E82, 1997.
17. Latipää PM, Hiltunen K, Peuhkurinen KJ, and Hassinen IE. Regulation of fatty acid oxidation in heart muscle. Effects of pyruvate and dichloroacetate. *Biochim. Biophys. Acta* 752: 162-171, 1983.
18. Lerch R. Oxidative substrate metabolism during postischemia reperfusion. *Basic Res. Cardiol.* 88: 525-544, 1993.
19. Lopaschuk GD, and Gamble J. Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 1101-1109, 1994.
20. McGarry JD. Ketogenesis and lipogenesis: metabolic integration in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 481-485, 1995.
21. McGarry JD, Mills SE, Long CS, and Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem. J.* 214: 21-28, 1983.

22. Opie LH, and Owen P. Effects of increased mechanical work by isolated perfused rat heart during production or uptake of ketone bodies. *Biochem. J.* 148: 403-415, 1975.
23. Parlo RA, and Coleman PS. Continuous pyruvate carbon flux to newly synthesized cholesterol and the suppressed evolution of pyruvate-generated CO₂ in tumors: further evidence for a persistent truncated Krebs cycle in hepatomas. *Biochim. Biophys. Acta* 886: 169-176, 1986.
24. Payor AM. Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 663-682, 1999.
25. Plaut GW, Cook M, and Aogaichi T. The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissues from pig, ox and rat. *Biochim. Biophys. Acta* 760: 300-308, 1983.
26. Prentki M, and Corkey BE. Are the β -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM. *Diabetes* 45: 273-283, 1996.
27. Robinson BH, and Oei J. Citrate transport in guinea pig heart mitochondria. *Can. J. Biochem.* 53: 643-647, 1975.
28. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, and Witters LE. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 276: E1-E18, 1999.
29. Saddik M, Gamble J, Witters LA, and Lopaschuk GD. Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J. Biol. Chem.* 268: 25836-25845, 1993.
30. Saha AK, Laybutt DR, Dean D, Vavvas D, Sebkova E, Ellis B, Klimes I, Kraegen EW, Shafir E, and Ruderman NB. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 276: E1030-E1037, 1999.
31. Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazipis A, Witters LA, Shafir E, and Ruderman NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 272: E641-E648, 1997.
32. Sluse FE, Meijer AJ, and Tager JM. Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett.* 18: 149-153, 1971.
33. Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP, and Henningsen P. Myocardial exchanges of glutamate, alanine and citrate in controls and patients with coronary artery disease. *Clin. Sci.* 64: 33-40, 1983.

34. Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP, and Henningsen P. Cardiac metabolic and hemodynamic effects of insulin in patients with coronary artery disease. *Diabetes* 38: 1175-1180, 1989.
35. van der Vusse GJ, and de Groot MJM. Interrelationship between lactate and cardiac fatty acid metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* 116: 11-17, 1992.

CHAPITRE IV : MANUSCRIT II

METABOLIC PHENOTYPING OF THE DISEASED RAT HEART USING ^{13}C -SUBSTRATES AND *EX VIVO* PERFUSION IN THE WORKING MODE

***Geneviève Vincent, Maya Khairallah, Bertrand Bouchard & Christine Des Rosiers
Molecular and Cellular Biochemistry 242: 89-99, 2003***

Nom de la revue : *Molecular and Cellular Biochemistry*

Nom de l'éditeur : *N.S. Dhalla*

Identification de l'article : *Geneviève Vincent, Maya Khairallah, Bertrand Bouchard & Christine Des Rosiers. Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode. Molecular and Cellular Biochemistry 242: 89-99, 2003*

Geneviève Vincent est autorisée à Inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 : implications du citrate »

NARANTAN S. DHALLA

Editor's name



Signature

April 10, 2003

Date

Geneviève Vincent

Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

Geneviève Vincent, Maya Khairallah, Bertrand Bouchard & Christine Des Rosiers.

Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ^{13}C -substrates and ex vivo perfusion in the working mode

Molecular and Cellular Biochemistry 242: 89-99, 2003

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Geneviève Vincent inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : « Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur l'analyse d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 : implications du citrate »

Maya Khairallah

2003.4.8

Bertrand Bouchard

2003-4-7

Dr Christine Des Rosiers

14 avril 2003

CONTRIBUTION DES AUTEURS

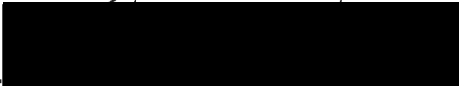
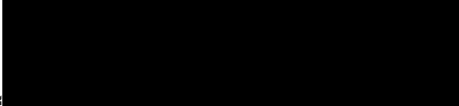
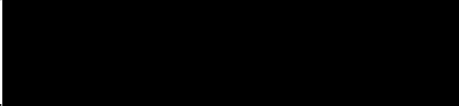
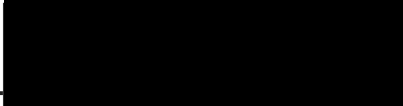
La réalisation de la présente étude a nécessité la mise en place d'un nouveau système de perfusion de cœur de rat (le système du « cœur au travail ») dans le laboratoire du métabolisme intermédiaire, ce qui fut réalisé par Geneviève Vincent. Précisément, le début de l'étude a été précédé par près d'une année de travail afin de mettre au point le nouveau système de perfusion. Ainsi, il a fallu perfectionner les techniques chirurgicales et s'assurer de la validité et de la reproductibilité des expérimentations réalisées.

Geneviève Vincent, en tant que premier auteur du manuscrit, a contribué à l'élaboration des objectifs et hypothèses de l'étude. Elle a effectué la grande majorité des expérimentations décrites dans le manuscrit. De plus, elle a contribué à la rédaction et la publication de l'étude.

Maya Khairallah, étudiante au doctorat, a participé à la mise au point du protocole permettant la détermination des vitesses de captation et d'efflux de lactate et de pyruvate par les cœurs perfusés. En outre, elle a grandement collaboré à la réalisation des travaux présentés dans ce manuscrit.

Bertrand Bouchard, assistant de recherche au laboratoire du métabolisme intermédiaire, a contribué à la présente étude en ce qui a trait au soutien technique lors des perfusions de cœur de rat. Il a également effectué la quantification tissulaire des intermédiaires du cycle de Krebs, tel que présenté à la figure 2B du manuscrit.

Dr Christine Des Rosiers a directement supervisé et contribué à toutes les étapes de la réalisation de ce manuscrit.

| | | |
|---------------------------------|--|----------------------|
| Geneviève Vincent |  | <i>7 avril 2003</i> |
| Maya Khairallah |  | <i>2003.4.8</i> |
| Bertrand Bouchard |  | <i>2003-4-7</i> |
| Dr Christine Des Rosiers |  | <i>14 avril 2003</i> |

METABOLIC PHENOTYPING OF THE DISEASED RAT HEART USING ^{13}C -SUBSTRATES AND *EX VIVO* PERFUSION IN THE WORKING MODE

Geneviève Vincent¹, Maya Khairallah¹, Bertrand Bouchard & Christine Des Rosiers^{1,2}.

Departments of Biochemistry¹ and Nutrition², University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7.

Running title: *Metabolic phenotyping of the diseased heart*

ABSTRACT

The objective of the present study was to compare energy substrate fluxes through metabolic pathways leading to mitochondrial citrate synthesis and release in normal and diseased rat hearts using ^{13}C -substrates and mass isotopomer analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). This study was prompted by our previous finding of a modulated citrate release by perfused rat hearts and by the possibility that a dysregulated myocardial citrate release represents a specific chronic alteration of energy metabolism in cardiac patients. The 15-week-old spontaneously hypertensive rat (SHR) was chosen as our animal model of disease and the Wistar-Kyoto (WKY) rat as its matched control. *Ex vivo* work-performing hearts were perfused with a semi-recirculating buffer containing physiological concentrations of unlabeled (glucose) and ^{13}C -labeled ($[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ (lactate + pyruvate) and/or $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ oleate) substrates. In parallel to the continuous monitoring of indices of the heart's functional and physiological status, the following metabolic parameters were documented: (i) citrate release rates and citric acid cycle intermediate tissue levels, (ii) the contribution of fatty acids as well as pyruvate decarboxylation and carboxylation to citrate synthesis, and (iii) lactate and pyruvate uptake and efflux rates. Working hearts from both rat species showed a similar percent contribution of carbohydrates for citrate synthesis through decarboxylation (70%) and carboxylation (10%). SHR hearts showed the following metabolic alterations: a higher citrate release rate, which was associated with a parallel increase in its tissue level, a lower contribution of oleate β -oxidation to citrate synthesis, and an accelerated efflux rate of unlabeled lactate from glycolysis. These metabolic changes were not explained by

differences in myocardial oxygen consumption, cardiac performance or efficiency, nor correlated with indices of tissue necrosis or ischemia. This study demonstrates how the alliance between *ex vivo* semi-recirculating working perfused rat hearts with ^{13}C -substrates and mass isotopomer analysis by GCMS, can provide an unprecedented insight into the metabolic phenotype of normal and diseased rat hearts. The clinical relevance of metabolic alterations herein documented in the SHR heart is suggested by its resemblance to those reported in cardiac patients. Taken altogether, our results raise the possibility that the increased citrate release of diseased hearts results from an imbalance between citrate synthesis and utilization rates, which becomes more apparent under conditions of substrate abundance.

Key words: SHR hearts, citrate release, citric acid cycle, energy metabolism, substrate flux parameters, isotopomer analysis

INTRODUCTION

The design of new treatments and optimization of current interventions to improve the statistics as well as the quality of life of patients suffering from cardiac diseases require a better understanding of the factors involved in such diseases. These factors include chronic alterations of myocardial energy metabolism such as a modified substrate oxidation profile with greater citrate and lactate release rates (1-7). To better understand the causes and significance of these metabolic alterations, the use of isotopically-labeled substrates, both *in vivo* and *ex vivo/in vitro*, has proven to be a very valuable approach (see Ref. 8 for a recent review). Compared to measurements of metabolites, mRNA or protein levels, substrates labeled with radioactive (^{14}C , ^3H) or stable isotopes (^{13}C , ^2H) offer the possibility of evaluating the dynamic aspects of cardiac metabolism, namely substrate flux through pathways leading to energy production. Typically, tracing of energy substrate metabolism involves the determination of label incorporation into a metabolite and/or product reflecting glycolysis, glucose and fatty acid β -oxidation and/or the citric acid cycle (CAC). In recent years, studies with ^{13}C -substrates and either nuclear magnetic resonance (NMR) or gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) expanded the field through the analysis of ^{13}C -isotopomers of relevant intermediary metabolites.

One advantage of GCMS over NMR is its greater sensitivity that enables the determination of ^{13}C -enrichment of metabolites in the nanomolar range, which include CAC intermediates (9-14).

We developed a strategy, using ^{13}C -substrates and GCMS, to assess substrate fluxes through metabolic pathways leading to citrate synthesis in *ex vivo* Langendorff-perfused rat hearts (9-12) and *in situ* perfused pig hearts (13-14). As the first intermediate committed to the CAC, citrate plays a crucial role in cardiac energy metabolism. In addition, cytosolic citrate is proposed to play a role in substrate fuel partitioning by restricting glycolysis at the level of phosphofructokinase and/or long chain fatty acid (LCFA) β -oxidation following its conversion to malonyl-CoA, an inhibitor of carnitine palmitoyl transferase I (15-16). However, in the heart, the regulatory role of cytosolic citrate has been a subject of controversies because of the low activity of the mitochondrial tricarboxylate transporter (17-18). Interestingly, in one of the aforementioned studies, we found that hearts perfused with ^{13}C -substrates constantly release small quantities of citrate (nmol) whose ^{13}C -labeling pattern reflected that of tissue citrate, suggesting that citrate release reflected its mitochondrial efflux (9-10). In a subsequent study, citrate release was shown to be modulated by energy demand and substrate supply for citrate synthesis, namely, oxaloacetate (OAA) and acetyl-CoA, in agreement with the proposed role of cytosolic citrate in fuel partitioning (12). These observations and the possibility that myocardial citrate release represents a specific chronic alteration of energy metabolism in patients suffering from cardiac diseases (1-3) prompted us to further examine this process, using ^{13}C -substrates and GCMS, in an animal model of cardiac pathology.

For this study, we chose a genetic model of hypertrophy, the 15-week-old SHR. Age-matched WKY rats served as controls. SHR develop cardiac hypertrophy between 9 and 12 weeks of age; at 15 weeks of age, the cardiac hypertrophy appears to be well compensated (19-20). There is general agreement that the development of cardiac hypertrophy is associated with a metabolic shift from fatty acid to glucose utilization for energy production, referred to as the fetal metabolic phenotype (see for example Refs 21-26). However, it appears unclear whether increased glycolysis is associated with an increased lactate efflux and/or lower carbohydrate oxidation (22-24, 26) given the evidence for compartmentation of

lactate metabolism in the heart (27). In the light of these observations, we considered it important to design our ^{13}C -protocol to assess rates of lactate and pyruvate uptake and efflux (27) in parallel to fluxes through pathways leading to citrate synthesis and release.

Therefore, the objective of the present work was to quantitate substrate fluxes through metabolic pathways leading to citrate synthesis and release as well as fluxes through pathways affected by hypertrophy, in *ex vivo* work-performing SHR and WKY rat hearts. For this purpose, working hearts were perfused with buffer containing ^{13}C -substrates in a semi-recirculating mode to prevent recycling of unlabeled and ^{13}C -labeled metabolites, which is essential to the application of our ^{13}C -protocol (9-10, 12). In parallel to the continuous monitoring of indices of cardiac performance, the following metabolic parameters were documented: (i) citrate release rates and CAC intermediate tissue levels, (ii) the contribution of fatty acids as well as pyruvate decarboxylation and carboxylation to citrate synthesis, and (iii) lactate and pyruvate uptake and efflux rates. The results obtained demonstrated the following metabolic alterations in SHR hearts: higher citrate release rates and tissue levels, lower relative contribution of oleate β -oxidation to citrate synthesis as well as accelerated efflux of unlabeled lactate, presumably from glycolysis. These metabolic changes resembled those reported for cardiac patients.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The sources of chemicals, biological products and ^{13}C -substrates have been identified previously (9-12). Bovine serum albumin fatty acid-free (BSA fraction V, Intergen: 300 g of BSA in 1.5 L of modified Krebs-Henseleit buffer without glucose, with 0.1 mM EDTA) was dialyzed in membranes (molecular weight cut-off 6,000 to 8,000) at 4°C against 25 L of the same buffer for 28 h to reduce the background citrate concentration to the low μM range ($1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$).

Heart perfusions in semi-recirculating working mode

Animal experimentation was approved by the local ethics committee in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male SHR and WKY rats (15-week-old; 300-330 g; Charles River) were provided with food and water ad libitum. After anesthesia by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg), hearts were cannulated rapidly and perfused retrogradely through the aorta at a constant pressure of 70 mmHg with semi-recirculating modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer containing (pH 7.4): 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM lactate and 0.2 mM pyruvate. A 10-min perfusion period was allowed for the insertion of a polyethylene catheter (PE-50) through the pulmonary vein into the left ventricle. The PE tubing, pulled through the ventricular wall and anchored in the apex of the heart by a fluted end, was connected to a pressure transducer for continuous monitoring of left ventricular function. The left atrium was then cannulated through the pulmonary vein. Spontaneously beating hearts were switched to the anterograde work-performing mode and perfused via the left atrial cannula with semi-recirculating modified Krebs buffer (see Perfusion protocols for details). Pressure of aortic afterload was set at 80 mmHg. Atrial preload was monitored continuously by a pressure transducer (Digi-Med Blood Pressure Analyzer, Micro-Med) and maintained at 11.5 mmHg. The present set up for working heart perfusions in the semi-recirculating mode, which is depicted in Figure 1, is similar to that described for the perfusion of working hearts in the recirculating mode (8) except for the following. The coronary effluent, which contains various metabolites released by the heart, is not recirculated but collected continuously. Thus, only aortic outflow is recirculated into the buffer reservoir. Consequently, the volume of buffer needed for a given perfusion experiment, 800 ml for 30 min, is greater than for similar heart perfusion in the recirculating mode. Proper oxygenation of 800 ml buffer containing fatty acid bound to albumin (pO₂: 500-550 mmHg) was achieved by its continuous pumping at a rate of 75 ml/min through a jacketed glass oxygenator consisting in part of 25-ft long silicone tubing rolled tightly in the gassed chamber (28). Excess buffer was returned to the main reservoir through the overflow outlet of the oxygenator.

The following functional parameters were monitored continuously during the perfusion experiments: (i) atrial inflow and aortic outflow, using calibrated electromagnetic flow probes (Model FM501, Carolina Medical Electronics Inc.), (ii) temperature, with a thermocouple, and (iii) left ventricular contractile functions, namely, heart rate (HR), maximum left ventricular pressure (LVP_{max}), left ventricular end-diastolic pressure (LVEPD), and maximum value for the first derivative of LVP ($+dP/dt_{max}$), by pressure transducer (Digi-Med Heart Performance Analyzer, Micro-Med). The following physiological parameters were determined in influent and effluent perfusates collected at 20 min with a blood gas, electrolytes and pH analyzer (ABL 77 series, Radiometer Copenhagen): pO_2 , pCO_2 , Ca^{2+} and other ion concentrations, and pH.

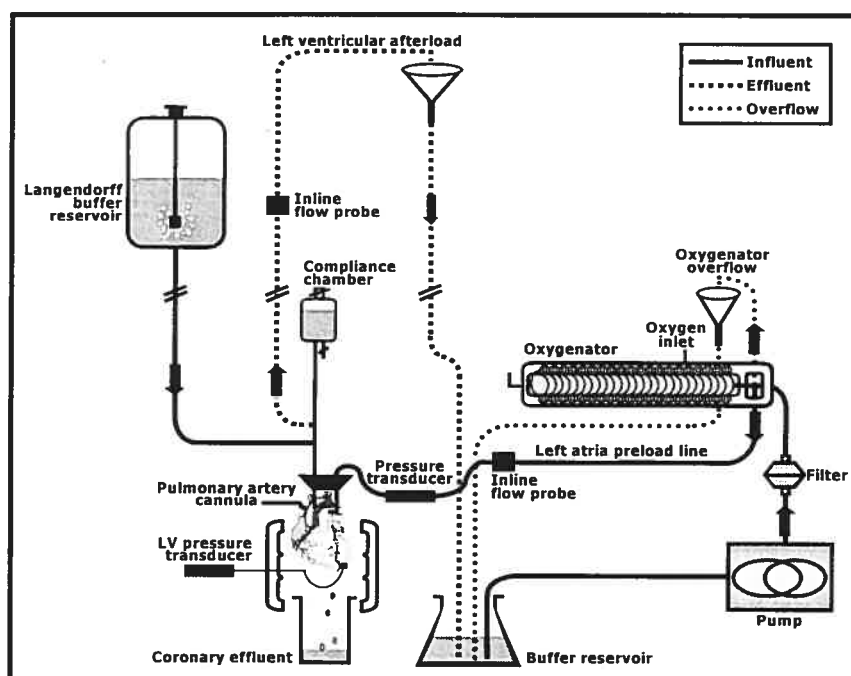


Figure 1. Schematic overview of the semi-recirculating working heart set up

See *Materials and Methods* for details. LV pressure transducer: left ventricular pressure transducer.

Perfusion protocols

Hearts from WKY rats and SHR were perfused for 30 min with semi-recirculating Krebs buffer containing physiological concentrations of glucose (5.5 mM), insulin (8 nM), carnitine (50 μ M), $[U-^{13}C_3]$ lactate (1 mM), and $[U-^{13}C_3]$ pyruvate (0.2 mM), in the absence ($n = 8$) or presence of $[1-^{13}C]$ oleate (0.4 mM) complexed to 3% dialyzed

albumin, and 0.1 mM EDTA (n = 4-6). We also conducted a set of perfusion experiments with [1-¹³C]oleate as the only ¹³C-substrate (n = 4). The ionized calcium concentration of the albumin-containing buffer was determined to be 1.8 mM. The substrate concentrations in the perfusion buffer mimic those of plasma. Lactate and pyruvate were added in a physiological ratio to clamp the redox state and hence minimize perturbations of the cytosolic redox state that occur when lactate is supplied alone. The addition of carnitine compensates for its potential loss during heart isolation (29). We verified that substrate concentrations and ¹³C-enrichments in the buffer reservoir remained unchanged throughout the perfusion. A near isotopic steady-state was reached after 20-25 min of heart perfusion in the working mode with ¹³C-substrates. Therefore, we chose 30 min as the duration of our perfusion experiments, after which the hearts were freeze-clamped with aluminium tongs chilled in liquid N₂. Under all conditions, citrate release rates (25-30 min), lactate and pyruvate uptake and efflux rates (25-30 min), and lactate dehydrogenase release rates (LDH; 5, 15 and 25 min) were quantitated from influent and effluent perfusate samples collected at the times indicated, while ¹³C-enrichment and concentration of CAC intermediates (citrate, α-ketoglutarate (α-KG), succinate, fumarate, malate and OAA) as well as flux ratios relevant to substrate selection for citrate synthesis, namely, pyruvate and fatty acids from ¹³C-enrichment of the acetyl (carbons 4 and 5: C₄₊₅) and OAA (C₁₊₂₊₃₊₆) moiety of citrate were measured in freeze-clamped powdered tissues.

Analytical procedures

Citrate release rates were quantitated by isotope dilution GCMS and flow rate measurements, as described previously (12). Tissue levels of CAC intermediates were determined in 100-mg tissue samples spiked with 10 nmol [1,5-¹³C₂]citrate, 25 nmol [1,4-¹³C₂]succinate, and 5 nmol [U-¹³C₄]fumarate. Quantification was achieved using standard curves. GCMS assays of ¹³C-mass isotopomer distribution (MID) of CAC intermediates and related metabolites in heart tissue samples (citrate and its OAA moiety, α-KG, succinate, fumarate, malate and pyruvate) have been described previously in detail (9-12). Perfusate lactate concentration and LDH activity were determined by enzymatic assay with a Roche Cobas Fara spectrophotometer (11-12, 30). The ¹³C-MID of lactate and pyruvate in influent and effluent perfusates was determined after treatment with 1 M NaB²H₄ (see *Calculations* below for details).

Calculations

Myocardial oxygen consumption (MVO_2 ; $\mu\text{mol}/\text{min}$) was calculated from the product of O_2 concentration (mM) difference between influent and effluent perfusates coming out of the oxygenator and pulmonary artery, respectively, and the coronary flow rate (ml/min). A value of 1.06 mM was taken as the concentration of dissolved O_2 at 100% saturation (31). Intracellular pH value was calculated using venous CO_2 pressure (pCO_2 , mmHg), as described by Bünger et al. (32): $pHi = 7.524e^{(-0.0008786 \cdot pCO_2)}$. Rate pressure product (RPP; $\text{mmHg} \cdot \text{beats} \cdot \text{min}^{-1}$) was calculated from: $[(LVP_{\text{max}} (\text{mmHg}) - LVEPD (\text{mmHg})) \cdot HR (\text{beats}/\text{min})]$. Cardiac power [CP (mWatts) = cardiac output (m^3/sec) \cdot LVP_{dev} (Pascals) \cdot 1000] and cardiac efficiency [CE ($\text{mWatts}/\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) = CP (mWatts) / MVO_2 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)] were calculated with a conversion factor of 133.32 Pascals per mmHg. To express tissue metabolite concentrations per g dry weight, the conversion factor for 1 g of freeze-clamped powdered heart tissue was determined to be 8.9 ± 0.2 ($n = 29$).

Mass isotopomers of metabolites containing 1 to n ^{13}C -atoms were identified as Mi with $i = 1, 2, \dots, n$. The absolute molar percent enrichment (MPE) of individual ^{13}C -labeled mass isotopomers (Mi) of a given metabolite was calculated as follows:

$$\text{MPE} (Mi) = \% A_{Mi} / [A_M + \sum A_{Mi}], \quad (1)$$

where A_M and A_{Mi} represent the peak areas from ion chromatograms corrected for natural abundance, corresponding to unlabeled (M) and ^{13}C -labeled (Mi) mass isotopomers, respectively.

Flux parameters

The development of equations to calculate flux ratios relevant to citrate synthesis in hearts perfused with $[U-^{13}\text{C}_3](\text{lactate} + \text{pyruvate})$ and/or $[1-^{13}\text{C}] \text{oleate}$ has been described previously in detail (9-10, 12). In brief, flux ratios were calculated from the measured MID of the following tissue metabolites: citrate and its OAA moiety (OAA^{CIT}), from which we extrapolated the acetyl moiety of citrate (AC^{CIT}), pyruvate and succinate. In this study, we reported the following flux rates, expressed relative to that of citrate synthase (CS): (i) oleate oxidation: $\text{OLE}/\text{CS} = 9 \cdot M1 \text{ AC}^{\text{CIT}}/M1 \text{ oleate}$ (Eq. 3 of Ref. 12), (ii) pyruvate decarboxylation: $\text{PDC}/\text{CS} = M2 \text{ AC}^{\text{CIT}}/M3$

pyruvate (Eq. 5 of Ref. 9), (iii) pyruvate carboxylation: $PC/CS = OAA^{CIT}/M3$ pyruvate (Eq. 4 of Ref. 9), and (iv) the contribution of other substrates (OS), such as endogenous fatty acids and/or amino acids, to the formation of acetyl-CoA: $OS/CS = 1 - (PDC/CS + OLE/CS)$. The measured MPE M3 OAA^{CIT} was corrected for the fraction of M3 OAA molecules coming from citrate isotopomers metabolized in the CAC, as described in detail in Ref. 9 (Eqs. 8-10).

To extrapolate the MPE of AC^{CIT} from the measured MID of citrate and of its OAA moiety, we used different mathematical approaches that depended on the choice of ^{13}C -substrate(s). For hearts perfused with $[1-^{13}C]$ oleate as the sole ^{13}C -substrate, we employed Eqs. 18-19 of Ref. 9. For hearts perfused with $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate) in the absence or presence of $[1-^{13}C]$ oleate, we used Eqs. 2 and 2a, respectively:

$$MPE\ M2\ AC^{CIT} = 0.5 * [\sum MPE\ (M_i * i)\ (citrate - OAA^{CIT})] \quad (2)$$

$$MPE\ M2\ AC^{CIT} = 0.5 * [\sum MPE\ (M_i * i)\ (citrate - OAA^{CIT}) - MPE\ M1\ AC^{CIT}] \quad (2a)$$

Eq. 2 provides a simple mean to extrapolate the MPE AC^{CIT} from the measured MID of citrate and OAA^{CIT} in hearts perfused with $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate) as the only ^{13}C -substrates. In Eq. 2a, the MPE M1 of AC^{CIT} resulting from oleate oxidation was determined in separate experiments in which $[1-^{13}C]$ oleate was the only ^{13}C -substrate. These equations were used because the MPE values of AC^{CIT} calculated with Eqs. 18-19 of Ref. 9 were imprecise. This is explained by the fact that tissue citrate was predominantly enriched in isotopomers of higher masses (M3-M6), while Eqs. 18-19 are based solely on the MPE M1 and M2 of citrate and OAA^{CIT} (see Ref. 9 for details).

Lactate and pyruvate uptake and efflux rates

These rates were determined by a modification of the NMR approach described recently (27). In brief, in hearts perfused with a non-recirculating buffer containing unlabeled glucose and $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate), lactate produced by glycolysis from exogenous glucose and endogenous glycogen is unlabeled (M) and can be distinguished by GCMS from the $[U-^{13}C_3]$ lactate (M3) added to the buffer. The

uptake of $^{13}\text{C}_3$ -labeled lactate is quantified from the difference between its influent and effluent perfusate concentration. In practice, the MID of perfusate lactate and pyruvate was determined by GCMS in samples treated with 1 M NaB^2H_4 . This treatment reduces pyruvate into lactate, and the 4 mass isotopomers of lactate obtained can be distinguished by GCMS: ^{12}C -lactate \rightarrow ^{12}C -lactate (M), ^{13}C -lactate \rightarrow ^{13}C -lactate (M3), ^{12}C -pyruvate \rightarrow ^{12}C -lactate deuterated (M1), and ^{13}C -pyruvate \rightarrow ^{13}C -lactate deuterated (M4). The concentrations of unlabeled (M, M1) and ^{13}C -labeled (M3, M4) lactate and pyruvate were calculated from their corresponding MIDs and enzymatically-determined perfusate lactate concentrations, which included both unlabeled (M) and ^{13}C -labeled lactate (M3). Efflux and uptake rates of lactate and pyruvate ($\mu\text{mol}/\text{min}$) were obtained by multiplying their perfusate concentrations in unlabeled (M, M1) and ^{13}C -labeled (M3, M4) ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) isotopomers, respectively, by the coronary flow rate (ml/min).

Statistical analysis

The data are expressed as means \pm S.E. of $n = 4-8$ heart perfusions. The unpaired t -test was applied for statistical evaluation of the data. A probability of $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

As a whole, the metabolic parameters measured in hearts perfused under normoxia for 30 min with a non-recirculating buffer containing 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μM carnitine, 1 mM $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ lactate, 0.2 mM $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ pyruvate, in the absence or presence of 0.4 mM $[1-^{13}\text{C}]$ oleate/albumin, showed a similar trend. Furthermore, for most parameters, differences observed between WKY and SHR hearts were independent of the presence of oleate. Therefore, due to space limitation, we chose to present in greater detail the results obtained with WKY and SHR hearts perfused in the presence of the LCFA oleate since this condition better mimics the physiological setting. However, we will report in the text any differences in values for functional and metabolic parameters measured in WKY and SHR hearts perfused in the absence of oleate.

Functional and physiological parameters

The values of the various functional and physiological indices measured throughout the perfusion experiments in the presence of oleate are summarized in Table 1. All measured values, in both WKY and SHR hearts, were comparable to those reported in the literature (22, 33). Thus, except for slightly higher aortic flow, SHR hearts showed values similar to that of WKY hearts for all parameters measured, including MVO_2 , cardiac flows, CP and CE. In the absence of oleate, SHR hearts showed values for RPP, LVP_{dev} , cardiac flows, CP and CE that were similar to those observed in the presence of oleate (data not shown). However, they were significantly lower than those measured in WKY hearts (RPP = 43.7 ± 2.2 mmHg \cdot beats \cdot min $^{-1}\cdot 10^{-3}$; LVP_{dev} = 203 ± 8 mmHg; cardiac output = 66 ± 3 ml/min; aortic flow = 48 ± 2 ml/min; CP = 30 ± 2 mWatts, and CE = 3.4 ± 0.2 mWatts/ μ mol \cdot min $^{-1}$; $P < 0.05$). Under all conditions examined, LDH release rates were low (< 125 mU/min) and similar for both rat species.

Table 1. Functional and physiological parameters of perfused working WKY and SHR hearts

| Parameters | WKY | SHR |
|--|-----------------|-----------------|
| HR (beats/min) | 225 \pm 12 | 237 \pm 9 |
| RPP (mmHg \cdot beats \cdot min $^{-1}\cdot 10^{-3}$) | 34.6 \pm 1.1 | 34.9 \pm 1.0 |
| LVP_{dev} (mmHg) | 155 \pm 11 | 148 \pm 6 |
| Cardiac output (ml/min) | 48 \pm 2 | 52 \pm 2 |
| Aortic flow (ml/min) | 30 \pm 2 | 35 \pm 1 * |
| Coronary flow (ml/min) | 18 \pm 2 | 17 \pm 1 |
| pHi | 7.35 \pm 0.02 | 7.35 \pm 0.01 |
| MVO_2 (μ mol/min) | 8.9 \pm 0.5 | 9.5 \pm 0.5 |
| CP (mWatts) | 16 \pm 1 | 18 \pm 1 |
| CE (mWatts/ μ mol \cdot min $^{-1}$) | 1.8 \pm 0.1 | 1.9 \pm 0.1 |

Data are means \pm S.E. of 4-6 heart perfusion experiments with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μ M carnitine, 1 mM [U- 13 C $_3$]lactate, 0.2 mM [U- 13 C $_3$]pyruvate and 0.4 mM [1- 13 C]oleate/albumin. Values of heart rate (HR), left ventricular pressure developed (LVP_{dev}) and cardiac flows, monitored throughout the perfusion experiments, were averaged for the entire 0-30-min period. MVO_2 and pHi, were calculated from pO_2 and pCO_2 values determined in influent and effluent perfusates collected at 20 min. RPP: rate pressure product; CP: cardiac power; CE: cardiac efficiency. * $P < 0.05$: SHR vs. WKY.

Citrate release rates and CAC intermediate tissue concentrations

Similar to Langendorff-perfused hearts (9-10, 12), hearts perfused in the working mode with non-recirculating buffer containing ^{13}C -substrates constantly released a small amount of citrate, whose ^{13}C -MID reflected that of tissue citrate (data not shown). Furthermore, citrate release was not correlated with that of LDH, an index of necrosis, or succinate, an index of ischemia (between 10 and 13 nmol/min) (10). The citrate release rates of WKY and SHR hearts perfused in the absence or presence of oleate ranged between 5 and 15 nmol/min. Figure 2A presents the citrate release rates for WKY and SHR hearts perfused in the presence of oleate. The results showed a significantly higher release rate for SHR hearts. In the absence of oleate, citrate release rates of WKY and SHR hearts revealed a similar pattern but only when the data were expressed relative to their respective CP (data not shown).

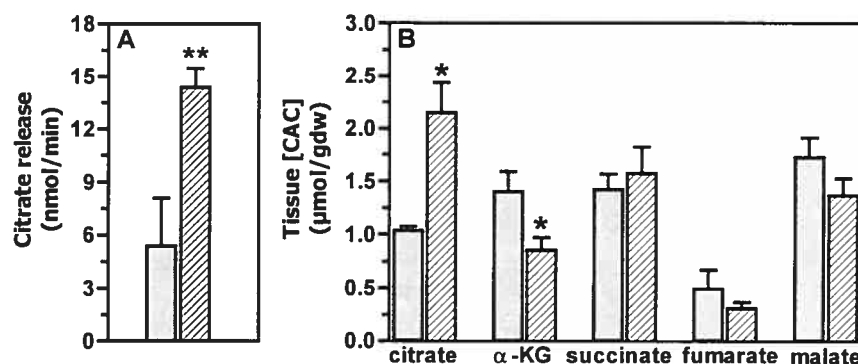


Figure 2. Citrate release rates (A) and CAC intermediate tissue concentrations (B) in WKY (filled bars) and SHR (hatched bars) hearts

Data are means \pm S.E. of 4-6 heart perfusion experiments with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μM carnitine, 1 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, 0.2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, and 0.4 mM $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{oleate/albumin}$. Citrate release rates were quantitated in effluent perfusate samples, collected between 25-30 min, by isotope dilution GCMS and flow rate measurements. CAC intermediates were quantitated by GCMS in tissue homogenates spiked with standards. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$: SHR vs. WKY.

Figure 2B displays the tissue concentrations of citrate and other CAC intermediates measured in hearts perfused in the presence of oleate. Comparison of Figure 2A and B reveals that in SHR hearts, the citrate release rate and tissue level increased in parallel. This increment was specific for citrate. Indeed, the α -KG tissue level was decreased, while that of other CAC intermediates as well as total CAC pool size were similar for both rat species. For hearts perfused in the absence of oleate, the

total CAC pool size was 2-fold lower, and there was no difference in tissue citrate or α -KG levels between rat species, but SHR hearts showed a significantly greater tissue succinate levels (1.4 ± 0.1 vs 0.9 ± 0.1 $\mu\text{mol/g}$ dry weight; $P < 0.05$). Under all conditions, tissue levels of isocitrate represented less than 3% those of citrate and were similar for both rat species (data not shown).

¹³C-enrichment and flux data

Table 2 reports the MIDs of CAC intermediates isolated from WKY and SHR hearts perfused with [U -¹³C₃](lactate + pyruvate) and [1 -¹³C]oleate. Note that these data are representative of those obtained in hearts perfused in the absence of oleate. The ¹³C-MID data for the various CAC intermediates were similar in both rat species. From these ¹³C-enrichment data, we would like to emphasize the following points. First, tissue citrate was highly enriched in M4, M5 and M6 isotopomers, which is typical for hearts perfused with [U -¹³C₃](lactate + pyruvate) under conditions of substantial pyruvate decarboxylation (10). There was little ¹³C-labeling of CAC intermediates resulting from [1 -¹³C]oleate oxidation. In fact, when WKY and SHR hearts were perfused with [1 -¹³C]oleate as the sole ¹³C-substrate, we detected only M1 isotopomers for citrate and its OAA moiety (MPE citrate: 2.8 ± 0.4 and 1.2 ± 0.1 ; OAA^{CIT}: 1.3 ± 0.2 and 0.6 ± 0.1 , respectively; $P < 0.01$; SHR vs. WKY). Second, as observed previously for Langendorff-perfused rat hearts (9-12) and *in situ* perfused pig hearts (13), most of the ¹³C-dilution occurred between α -KG and succinate, suggesting a small entry of unlabeled carbon through anaplerosis ($P < 0.01$ vs. citrate, $n = 4-6$). The MIDs of malate and fumarate were identical, reflecting rapid equilibration by fumarase. Finally, the MPE in M3 of fumarate, malate and the OAA moiety of citrate was higher than that of succinate, indicating the entry of M3 isotopomers by pyruvate carboxylation.

Table 2. ^{13}C -Labeling of CAC intermediates isolated from working WKY and SHR hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ lactate, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ pyruvate and $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ oleate

| Metabolites | Rat species | MPE (%) | | | | | | ΣMi |
|--------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-------------------|
| | | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | |
| Citrate | WKY | 11.9 ± 0.3 | 18.4 ± 0.5 | 20.1 ± 0.5 | 15.7 ± 0.6 | 11.0 ± 0.6 | 4.3 ± 0.3 | 81.4 ± 2.0 |
| | SHR | 11.4 ± 0.5 | 18.9 ± 0.3 | 20.2 ± 0.1 | 16.0 ± 0.4 | 11.2 ± 0.5 | 4.6 ± 0.3 | 82.3 ± 0.5 |
| α -KG | WKY | 13.0 ± 0.3 | 21.6 ± 0.2 | 19.8 ± 0.5 | 15.1 ± 0.3 | 11.4 ± 0.4 | | 80.9 ± 1.0 |
| | SHR | 12.1 ± 0.4 | 21.7 ± 0.4 | 20.2 ± 0.2 | 15.1 ± 0.4 | 11.3 ± 0.7 | | 80.5 ± 0.6 |
| Succinate | WKY | 17.5 ± 1.0 | 19.7 ± 0.9 | 18.4 ± 1.0 | 11.5 ± 0.7 | | | 67.1 ± 3.5 |
| | SHR | 18.6 ± 0.4 | 20.5 ± 0.3 | 18.3 ± 0.5 | 11.0 ± 0.8 | | | 68.3 ± 1.4 |
| Fumarate | WKY | 19.1 ± 0.4 | 21.4 ± 0.3 | 21.5 ± 0.6 | 13.2 ± 0.5 | | | 75.3 ± 1.4 |
| | SHR | 19.1 ± 0.6 | 21.3 ± 0.3 | 21.0 ± 0.3 | 13.6 ± 0.5 | | | 75.0 ± 0.4 |
| Malate | WKY | 19.6 ± 0.5 | 21.3 ± 0.4 | 20.6 ± 0.5 | 12.4 ± 0.4 | | | 73.9 ± 1.5 |
| | SHR | 19.7 ± 0.5 | 21.1 ± 0.2 | 20.4 ± 0.2 | 12.1 ± 0.5 | | | 73.3 ± 0.4 |
| OAA ^{CIT} | WKY | 18.1 ± 0.7 | 23.8 ± 0.7 | 22.0 ± 1.4 | 7.3 ± 0.6 | | | 71.1 ± 2.3 |
| | SHR | 18.9 ± 1.3 | 24.6 ± 0.7 | 23.0 ± 1.0 | 8.0 ± 0.7 | | | 74.5 ± 1.0 |

Data are means \pm S.E. of 4-6 heart perfusion experiments with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μM carnitine, 1 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ lactate, 0.2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ pyruvate and 0.4 mM $[\text{1-}^{13}\text{C}]$ oleate/albumin. The MID of CAC intermediates was determined in tissue homogenates by GCMS.

Table 3 reports the MPE values for acetyl-CoA of citrate, the corrected OAA of citrate and the pyruvate as well as the flux parameters for WKY and SHR hearts perfused in the presence of oleate. From this table, it is apparent that the relative rate of pyruvate decarboxylation (PDC/CS), which was similar for WKY and SHR hearts, was the predominant source of acetyl-CoA for citrate synthesis in these hearts. From the MPE of tissue pyruvate in M3 isotopomers, we conclude that ca. 60% of tissue pyruvate arose from exogenously supplied pyruvate and/or lactate; the remaining 40% arose from exogenously supplied glucose and/or endogenous glycogen. The relative rate of oleate β -oxidation (OLE/CS) was below 20%, and was significantly greater for WKY than SHR hearts. Consequently, the relative contribution of other substrates to acetyl-CoA formation, such as endogenous fatty acids and/or amino acids, was also greater for SHR than WKY hearts (OS/CS = 0.25 \pm 0.02 and 0.09 \pm 0.01%, respectively; $P < 0.05$).

Table 3. ^{13}C -enrichment and flux values determined in perfused working WKY and SHR hearts

| MPE and Flux Values | WKY | SHR |
|--|-------------|---------------|
| MPE AC ^{CIT} : (M1) | 1.53 ± 0.31 | 0.65 ± 0.11 * |
| MPE AC ^{CIT} : (M2) | 45.9 ± 1.3 | 42.1 ± 2.7 |
| MPE OAA ^{CIT} corrected: (M3) | 5.07 ± 1.5 | 7.0 ± 1.1 |
| MPE pyruvate: (M3) | 62.1 ± 0.7 | 59.8 ± 1.5 |
| OLE/CS | 0.17 ± 0.03 | 0.07 ± 0.01 * |
| PDC/CS | 0.74 ± 0.03 | 0.70 ± 0.04 |
| PC/CS | 0.10 ± 0.03 | 0.12 ± 0.02 |
| PC/PDC | 0.14 ± 0.04 | 0.17 ± 0.03 |

Data are means ± S.E. of 4-6 heart perfusion experiments. Flux ratios are calculated from the measured MID of the following tissue metabolites: (i) citrate and of its OAA moiety ($\text{C}_{1+2+3+6}$; OAA^{CIT}), from which we extrapolate the acetyl moiety of citrate (C_{4+5} ; AC^{CIT}), (ii) pyruvate, and (iii) succinate. Flux parameters are expressed relative to citrate synthase (CS). The relative rate of oleate oxidation (OLE/CS = $9 \times \text{M1 AC}^{\text{CIT}}/\text{M1 oleate}$) was determined in hearts perfused with [^{13}C]oleate as the sole ^{13}C -substrate. The relative rates of pyruvate decarboxylation (PDC/CS = $\text{M2 AC}^{\text{CIT}}/\text{M3 pyruvate}$) and pyruvate carboxylation (PC/CS = $\text{OAA}^{\text{CIT}}/\text{M3 pyruvate}$) were determined in hearts perfused with [^{13}C](lactate + pyruvate) and [^{13}C]oleate as ^{13}C -labeled substrates. The MPE M3 of OAA^{CIT} was corrected for the formation of M3 OAA from CAC metabolism of citrate isotopomers (see *Materials and Methods*). * $P < 0.05$: SHR vs. WKY.

We also report, for the first time in the perfused working rat heart, the relative rates of pyruvate carboxylation (PC/CS), an anaplerotic reaction. From the PC/CS values, which were similar for both rat species, we conclude that this anaplerotic reaction generates ca. 10% of OAA for citrate synthesis. Thus, flux through pyruvate carboxylation was 6-fold lower than through pyruvate decarboxylation. Note that the precision of estimates for PC/CS was lower than for PDC/CS flux ratios. This was due to a high degree of ^{13}C -recycling in the CAC, as reflected by the 4-fold difference between the measured and corrected MPE M3 OAA moiety of citrate (ca. 20% and 5%, respectively, from Tables 2 and 3). In WKY and SHR hearts perfused in the absence of oleate, estimates of PC/CS (0.12 ± 0.01 and 0.13 ± 0.01 , respectively) and PC/PDC (0.17 ± 0.03 and 0.21 ± 0.02 , respectively) were similar to those obtained in the presence of oleate.

Lactate and pyruvate uptake and efflux rates

Figure 3A depicts the concentrations of unlabeled and ^{13}C -labeled lactate and pyruvate in influent and effluent perfusates of WKY and SHR hearts perfused in the

presence of oleate. Figure 3A is also representative of data obtained in hearts perfused in the absence of oleate. We found that under all conditions examined, the relative proportion of ^{13}C -lactate in the effluent perfusates was significantly lower than that of the influent perfusate, indicating the release of unlabeled lactate (Fig. 3A, left panel). However, at least for WKY hearts, total lactate concentration, that is, unlabeled plus labeled ($^{12}\text{C} + ^{13}\text{C}$), in influent and effluent perfusates was similar. This is because the increase in the concentration of ^{12}C -lactate in effluent perfusate was compensated by a similar decrease in the concentration of ^{13}C -lactate, reflecting its uptake. The situation differed for SHR hearts where total lactate concentration in the effluent perfusate was significantly greater than in the influent perfusate due to a proportionally greater increase in ^{12}C -lactate concentration in the effluent perfusate. In contrast to lactate, there was no increase in the proportion of unlabeled pyruvate in the effluent perfusate, although there was a decrease in that of ^{13}C -pyruvate (Fig. 3A, right panel; $P < 0.001$).

The results of Figure 3A and coronary flow rate measurements allow the calculation of lactate and pyruvate efflux and uptake rates, which are depicted in Figure 3B. These data demonstrates that SHR hearts showed higher efflux rates of unlabeled lactate compared to WKY hearts, indicating increased glycolytic activity. However, the rates of uptake of ^{13}C -labeled lactate and pyruvate did not differ significantly between rat species. Interestingly, while lactate and pyruvate are supplied at the physiological ratio of 5, lactate and pyruvate uptake rates differ only by a factor of 2, indicating preferential pyruvate uptake.

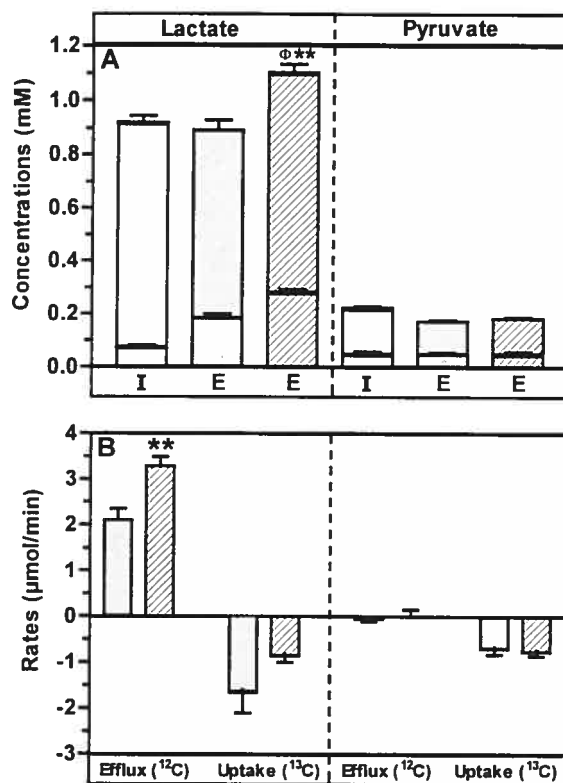


Figure 3. Total perfusate lactate and pyruvate concentrations (A) and lactate and pyruvate uptake and efflux rates (B) in WKY (filled bars) and SHR (hatched bars) hearts

Data are means \pm S.E. of 4-6 heart perfusion experiments with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μ M carnitine, 1 mM [U-¹³C₃]lactate, 0.2 mM [U-¹³C₃]pyruvate and 0.4 mM [1-¹³C]oleate/albumin. Stacked bars depict the concentrations of unlabeled (¹²C: lower part) and labeled (¹³C: upper part) lactate and pyruvate in influent (I; open bars) and effluent (E; hatched and filled bars) perfusates collected between 25 and 30 min and treated with NaB²H₄. Lactate and pyruvate efflux (¹²C) and uptake (¹³C) rates were calculated from the product of their concentration differences in influent and effluent perfusates and coronary flow rates. ** $P < 0.01$: SHR vs. WKY; and ^φ $P < 0.001$: effluent vs. influent perfusate.

DISCUSSION

This study reports for the first time a detailed comparison of substrate fluxes through metabolic pathways linked to energy production in normal WKY and diseased SHR hearts, using ¹³C-substrates and mass isotopomer analysis by GCMS. Specifically, our ¹³C-protocol was designed on the basis of previous studies in Langendorff-perfused rat hearts, to quantitate substrate fluxes through metabolic pathways leading to citrate synthesis and release as well as fluxes through pathways affected

by hypertrophy (21-26). For the present study, our ^{13}C -protocol was transposed to the *ex vivo* work-performing rat heart in view of its greater relevance to the *in vivo* situation in terms of energy demand (workload) and energy supply (substrates). Given the cost of ^{13}C -substrates, perfusion of working hearts with semi-recirculating buffer represents a valid compromise to meet the criteria for isotopic studies. The use of a recirculated buffer would impact on the capacity of the heart perfusion system to reach isotopic steady-state conditions and, hence, on the precision of estimated values of the flux parameters. Indeed, since the heart releases unlabeled and/or labeled metabolites, the ^{13}C -enrichment of supplied substrates changes with time. This point is best illustrated with lactate for which we report a higher concentration of unlabeled isotopomer, resulting in a lower percentage of ^{13}C -lactate in the effluent than influent perfusate (Fig. 3A).

The methodological limitations encountered in assessing flux parameters relevant to citrate synthesis in semi-recirculating working rat hearts are similar to those reported previously in *ex vivo* Langendorff-perfused rat hearts and *in situ* perfused pig hearts (9-14). These include potential slight underestimation of the relative contributions of pyruvate carboxylation and decarboxylation, since these flux ratios are calculated from whole-tissue pyruvate M3 enrichment rather than intracellular enrichment. In addition, under the conditions of the present study, we were unable to estimate the contribution of β -oxidation from 0.4 mM [1- ^{13}C]oleate in hearts perfused with [U- $^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate), as described previously (12), since tissue citrate was predominantly ^{13}C -labeled from the metabolism of [U- $^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate). Therefore, the low ^{13}C -enrichment of citrate in M1 isotopomers resulting from [1- ^{13}C]oleate oxidation (< 3%) was determined in separate perfusion experiments with [1- ^{13}C]oleate as the only ^{13}C -substrate. An alternative approach would be to perfuse hearts with [3- ^{13}C](lactate + pyruvate) and [U- ^{13}C]oleate, although the use of this ^{13}C -substrate mixture restricts flux measurements to the contributions of pyruvate and fatty acids to acetyl-CoA formation.

As a whole, hearts from control WKY rats perfused in the semi-recirculating work-performing mode showed values for indices of cardiac performance and MVO_2 and a pattern of substrate selection for energy production that are consistent with those reported by others for working normal rat hearts perfused under similar conditions

(22, 33). In brief, we estimated that more than 70% of acetyl-CoA for citrate synthesis is supplied by carbohydrates through pyruvate decarboxylation, and in the presence of 0.4 mM oleate, less than 20% arises from the β -oxidation of this exogenous LCFA. We also report, for the first time in the working heart, the following metabolic characteristics, which resembled those documented previously in *ex vivo* Langendorff-perfused rat hearts and *in situ* perfused pig hearts using ^{13}C -substrates and mass isotopomer analysis by GCMS (9-14). First, working hearts constantly release a small amount of citrate (5-15 nmol/min) at a rate representing at most 0.5% of the CAC flux rate. Second, the relative contribution of anaplerotic pyruvate carboxylation to OAA for citrate synthesis is estimated to be ca. 10% and compensates largely for the mitochondrial citrate efflux (34). Finally, working hearts simultaneously release unlabeled lactate and take up ^{13}C -labeled lactate and pyruvate for mitochondrial oxidation. Since lactate released by the heart was unlabeled, it is likely to reflect its production by glycolysis from exogenous glucose or endogenous glycogen. Based on measured lactate efflux rates, the percent contribution of this glycolytically-derived ATP is estimated to be ca. 5% of total mitochondrial ATP production resulting from carbohydrate and lipid oxidation (from MVO_2 values). It is noteworthy that our lactate uptake/efflux data are consistent with the proposed compartmentation of lactate metabolism in the heart, in which glycolytically-derived lactate production and oxidation of exogenous lactate operate as separate metabolic pathways (27). They are also consistent with the concept of an intracellular lactate shuttle (35).

Let us now examine functional and metabolic differences between working WKY and SHR hearts. As a whole, working SHR hearts perfused with a physiological substrate mixture maintained normal values for indices of contractile and physiological function. They showed a similar percent contribution of carbohydrates for citrate synthesis through decarboxylation (70%) and carboxylation (10%). However, they showed the following metabolic alterations: a 2.7-fold elevation in citrate release, a 4.3-fold lower contribution of β -oxidation of exogenous oleate to acetyl-CoA formation for citrate synthesis, and a 1.6-fold increase in the release of unlabeled lactate from glycolysis. These metabolic changes of working SHR hearts are consistent with those reported previously in this and other animal models of cardiac hypertrophy (e.g. aortic banding) and/or in cardiac patients, using other techniques

(1-3, 21-26). In brief, there is general agreement that the hypertrophied heart returns to the fetal metabolic phenotype. This implicates changes in gene expression for proteins involved in glucose, lactate and LCFA uptake and metabolism that result in a shift in the heart's substrate preference for energy production from fatty acids to carbohydrates. For example, the higher glycolytic rate probably results from a shift in LDH isoforms favouring glycolytic lactate efflux over oxidation. Although the percent of glycolytically derived ATP is only increased from 5 to at most 10%, this may be crucial for ion pump function (36). In addition, the lower contribution of β -oxidation from exogenous oleate to acetyl-CoA in SHR hearts is consistent with the reported defect in myocardial fatty acid uptake and β -oxidation (25).

This investigation reports also additional unique information relevant to our understanding of the metabolic causes underlying dysregulated citrate release in the diseased heart. In fact, we found that the greater citrate release by SHR hearts was not correlated with changes in total CAC pool size, indices of cellular integrity (LDH release) or ischemia (succinate release and pH_i). Based on measured MVO_2 values, one would presume that the CAC flux rate was not altered in SHR hearts. However, the observed differences in tissue levels of citrate (increased) and α -KG (decreased) in SHR hearts perfused in the presence of oleate, but not in the absence of oleate, suggest a potential imbalance in citrate synthesis (citrate synthase) and utilization (aconitase) rates, which becomes more apparent under conditions of mitochondrial substrate abundance. This interpretation would be consistent with our previous finding of modulation of mitochondrial citrate efflux by substrate supply (12), and with the reported lowering of myocardial citrate release in cardiac patients fed a low-fat low-calorie diet (2). Of potential significance, aconitase, whose total activity in heart homogenates is 10-fold lower than that of citrate synthase, is subject to inactivation by a number of free radicals (superoxide anions, nitric oxide and peroxynitrite) (37-39), which are among many factors involved in the pathophysiology of heart diseases (40). Restricted mitochondrial citrate utilization at the level of aconitase could impact on the contractile reserve of the hypertrophied heart. Further investigations are however needed to examine these aspects.

We recognize that the following considerations should be kept in mind regarding the results obtained in this study. First, although SHR hearts show many metabolic

characteristics similar to hypertrophied rat hearts after aortic banding (22), the SHR is a genetic model of cardiac diseases that also exhibit distinct features that are age-dependent (19, 41). Future studies are therefore warranted in SHR hearts to correlate metabolic changes in citrate synthesis and release with age and with a recognized indicator of the severity of disease, such as the expression of the atrial and/or brain natriuretic peptides (42). Second, its matched control, the WKY rat, has repeatedly been reported to present high biological variability since it may not constitute a single inbred strain (43-44). In this regard, we noticed and excluded some WKY rats with atypical and enlarged hearts. Finally, we chose to compare the metabolic phenotype of WKY and SHR hearts perfused at the same afterload, although SHR hearts are subject *in vivo* to a higher afterload. Nevertheless, working SHR hearts perfused at 80 mmHg showed values for cardiac flows and performance, MVO_2 and pH, that resembled those of working WKY hearts. As a whole, the working SHR heart revealed alterations in carbohydrate and lipid metabolism that are consistent with those reported for age-matched SHR, using other techniques (22). In view of our previous finding of modulation of citrate release by energy demand in Langendorff-perfused rat hearts, one might wonder, however, what would be the impact of a higher workload on the citrate release rate. This is, in fact, difficult to predict for SHR hearts because of the possibility of an imbalance between citrate synthesis and utilization rates. Furthermore, it remains to be demonstrated whether citrate release is modulated by energy demand in the more physiological *ex vivo* work-performing rat heart. Therefore, additional series of perfusion experiments are needed to document the effect of different workloads and fatty acid concentrations on metabolic pathways linked to citrate synthesis and release, both in WKY and SHR working hearts.

In conclusion, this study demonstrates how the alliance between *ex vivo* semi-recirculating working perfused rat hearts with ^{13}C -substrates and mass isotopomer analysis by GCMS, can provide an unprecedented insight into the metabolic phenotype of normal and diseased rat hearts. Given the high sensitivity of GCMS, we foresee no major difficulties in transposing our ^{13}C -protocol to the *ex vivo* working mice heart model, as it was done with radioactive substrates (45). In summary, the use of our ^{13}C -protocol in this study has enabled the demonstration of metabolic changes in SHR hearts, which include an accelerated efflux of citrate and unlabeled

lactate, as well as lower β -oxidation of exogenously-supplied LCFA. Similar metabolic alterations have been reported previously for cardiac patients, supporting the relevance of findings in our study model to the clinical situation (1-3). Interestingly, taken altogether, the results from this work raise the possibility that the increased citrate release by SHR hearts may result from an imbalance between citrate synthesis and utilization rates, which becomes more apparent under conditions of mitochondrial substrate abundance. In this regard, further investigations are warranted to specifically examine if changes in the activity and/or expression of CAC enzymes are part of the mitochondrial alterations associated with the progression of cardiac diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. John Chatham, Blandine Comte and Alain Comtois for their assistance in setting up the working heart preparation. Thanks are also due to Ovid Da Silva of the Research Support Office, CHUM Research Center, for editing this text. This work was presented at the XVII World Heart Congress of the International Society for Heart Research (ISHR) held in Winnipeg, and at its satellite meeting held in Banff in July 2001. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grants # 9575 and 10920 to C.D.R and a studentship to G.V.).

REFERENCES

1. Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP, Henningsen P: Myocardial exchanges of glutamate, alanine and citrate in controls and patients with coronary artery disease. *Clin Sci* 64: 33-40, 1983.
2. Thuesen L, Nielsen TT, Thomassen A, Bagger JP, Henningsen P: Beneficial effect of a low-fat low-calorie diet on myocardial energy metabolism in patients with angina pectoris. *Lancet* 2: 59-62, 1984.
3. Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP, Henningsen P: Cardiac metabolic and hemodynamic effects of insulin in patients with coronary artery disease. *Diabetes* 38: 1175-1180, 1989.
4. Opie LH: Cardiac metabolism--emergence, decline, and resurgence. Part I. *Cardiovasc Res* 26: 721-733, 1992.
5. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG: Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 33: 243-257, 1997.
6. Taegtmeyer H, Goodwin GW, Doenst T, Frazier OH: Substrate metabolism as a determinant for postischemic functional recovery of the heart. *Am J Cardiol* 80: 3A-10A, 1997.
7. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF: Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation* 105: 140-142, 2002.
8. Barr RL, Lopaschuk GD: Methodology for measuring in vitro/ex vivo cardiac energy metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* 43: 141-152, 2000.
9. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Des Rosiers C: Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C labeling of citrate released by perfused rat heart. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997.
10. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Des Rosiers C: A ^{13}C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997.
11. Laplante A, Vincent G, Poirier M, Des Rosiers C: Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A ^{13}C mass isotopomer study. *Am J Physiol* 272: E74-E82, 1997.

12. Vincent G, Comte B, Poirier M, Bouchard B, Des Rosiers C: Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol* 278: E846-856, 2000.
13. Panchal AR, Comte B, Huang H, Kerwin T, Darvish A, Rosiers CD, Brunengraber H, Stanley WC: Partitioning of pyruvate between oxidation and anaplerosis in swine hearts. *Am J Physiol* 279: H2390-H2398, 2000.
14. Panchal AR, Comte B, Huang H, Dudar B, Roth B, Chandler M, Des Rosiers C, Brunengraber H, Stanley WC: Acute hibernation decreases myocardial pyruvate carboxylation and citrate release. *Am J Physiol Heart* 281: H1613-H1620, 2001.
15. Depré C, Rider MH, Hue L: Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* 258: 277-290, 1998.
16. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LE: Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-E18, 1999.
17. Cheema-Dhadli S, Robinson BH, Halperin ML: Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can J Biochem* 54: 561-565, 1976.
18. Sluse FE, Meijer AJ, Tager JM: Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett* 18: 149-153, 1971.
19. Kinney Lapier TL, Rodnick KJ: Changes in cardiac energy metabolism during early development of female SHR. *Am J Hypertens* 13: 1074-1081, 2000.
20. Haneda T, Ichihara K, Abiko Y, Onodera S: Functional and metabolic responses to ischemia in the perfused heart isolated from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 50: 607613, 1986.
21. Barger PM, Kelly DP: Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci* 318: 36-42, 1999.
22. Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD: Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 267: H742-H750, 1994.
23. Christe ME, Rodgers RL: Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 26: 1371-1375, 1994.
24. Doenst T, Goodwin GW, Cedars AM, Wang M, Stepkowski S, Taegtmeyer H: Load-induced changes *in vivo* alter substrate fluxes and insulin responsiveness of rat heart *in vitro*. *Metabolism* 50: 1083-1090, 2001.

25. Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp FF Jr, Kurtz T, Pravenec M, Abumrad NA: Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* 276: 23661-23666, 2001.
26. Seymour A-M L, Chatham JC: The effects of hypertrophy and diabetes on cardiac pyruvate dehydrogenase activity. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2771-2778, 1997.
27. Chatham JC, Des Rosiers C, Forder JR: Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol* 281: E794-802, 2001.
28. Gamcsik MP, Forder JR, Millis KK, McGovern KA: A versatile oxygenator and perfusion system for magnetic resonance studies. *Biotechnology Bioengineering* 49: 348-354, 1996.
29. Rodgers RL, Christie ME, Tremblay GC, Babson JR, Daniels T: Insulin-like effects of a physiologic concentration of carnitine on cardiac metabolism. *Mol Cell Biochem* 226: 97-105, 2001.
30. Bergmeyer HU: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3, 2 ed. New York, Verlag Chemie International, Academic Press, 1974.
31. Starnes JW, Wilson DF, Erecinska M: Substrate dependence of metabolic state and coronary flow in perfused rat heart. *Am J Physiol* 249: H799-806, 1985.
32. Bünger R, Mallet RT, Hartman DA: Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem* 180: 221-233, 1989.
33. Goodwin GW, Cohen DM, Taegtmeyer H: [5-³H]glucose overestimates glycolytic flux in isolated working rat heart: role of pentose phosphate pathway. *Am J Physiol* 280: E502-E508, 2001.
34. Gibala MJ, Young ME, Taegtmeyer H: Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168: 657-665, 2000.
35. Brooks GA: Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc* 32: 790-799, 2000.
36. Weiss JN, Venkatesh N: Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovasc Drugs Ther* 7: 499-505, 1993.

37. Gardner PR, Fridovich I: Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J Biol Chem* 266: 19328-19333, 1991.
38. Janero DR, Hreniuk D: Suppression of TCA cycle activity in the cardiac muscle cell by hydroperoxide-induced oxidant stress. *Am J Physiol* 270: C1735-C1742, 1996.
39. Nulton-Persson AC, Szweda LI: Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276: 23357-23361, 2001.
40. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK: Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 506-514, 1996.
41. Rupp H, Schulze W, Vetter R: Dietary medium-chain triglycerides can prevent changes in myosin and SR due to CPT-1 inhibition by etomoxir. *Am J Physiol* 269: R630-R640, 1995.
42. Boomsma F, van den Meiracker AH: Plasma A- and B-type natriuretic peptides: physiology, methodology and clinical use. *Cardiovasc Res* 51: 442-449, 2001.
43. H'Doubler PB Jr, Petersen M, Shek W, Auchincloss H, Abbott WM, Orkin RW: Spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats are genetically disparate. *Lab Anim Sci* 41: 471-473, 1991.
44. Kurtz TW, Morris RC Jr: Biological variability in Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 10: 127-131, 1987.
45. Belke DD, Larsen TS, Lopaschuk GD, Severson DL: Glucose and fatty acid metabolism in the isolated working mouse heart. *Am J Physiol* 277: R1210-R1217, 1999.

CHAPITRE V : MANUSCRIT III

**DIFFERENTIAL MODULATION OF CITRATE SYNTHESIS AND RELEASE
BY FATTY ACIDS IN PERFUSED WORKING RAT HEARTS**

***Geneviève Vincent, Bertrand Bouchard, Maya Khairallah & Christine Des Rosiers
American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology***

Geneviève Vincent

Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal

***Geneviève Vincent, Bertrand Bouchard, Maya Khairallah & Christine Des Rosiers.
Differential modulation of citrate synthesis and release by fatty acids in perfused
working rat hearts
American Journal of Physiology - Heart and Circulation, 2004***

***À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Geneviève Vincent inclut cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre :
« Phénotypage métabolique du cœur sain et malade basé sur l'analyse
d'isotopomères de masse marqués au carbone 13 : implications du citrate »***

Bertrand Bouchard

2003-11-4

Maya Khairallah

2003-11-6

Dr Christine Des Rosiers

2003-1-4

DIFFERENTIAL MODULATION OF CITRATE SYNTHESIS AND RELEASE BY FATTY ACIDS IN PERFUSED WORKING RAT HEARTS

Geneviève Vincent¹, Bertrand Bouchard, Maya Khairallah¹ & Christine Des Rosiers¹²

Departments of Biochemistry¹ and Nutrition², University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: *Citrate metabolism in the working heart*

ABSTRACT

The objective of this study was to test the effect of increasing fatty acid concentrations on substrate fluxes through pathways leading to citrate synthesis and release in the heart. This was accomplished using semi-recirculating work-performing rat hearts perfused with substrate mixtures mimicking the *in situ* milieu (5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate and 0.4 mM oleate-albumin) and ¹³C-methods. Raising the fatty acid concentration from 0.4 to 1 mM with long-chain oleate or medium-chain octanoate resulted in a lowering (~20%) of cardiac output and efficiency with unaltered O₂ consumption. At the metabolic level, beyond the expected effects of high fatty acid levels on the contribution of pyruvate decarboxylation (reduced > 3-fold) and β-oxidation (enhanced ~ 3-fold) to citrate synthesis, there was also a 2.4-fold lowering of anaplerotic pyruvate carboxylation. Despite the dual inhibitory effect of high fatty acids on pyruvate decarboxylation and carboxylation, tissue citrate levels were 2-fold higher, but citrate release rates remained unchanged at 11-14 nmol/min, representing < 0.5% of citric acid cycle flux. A similar trend was observed for most metabolic parameters following oleate or octanoate addition. Altogether, these results emphasize a differential modulation of anaplerotic pyruvate carboxylation and citrate release in the heart by fatty acids. We interpret the lack of effects of high fatty acid concentrations on citrate release rates as suggesting that under physiological conditions, this process is maximal, probably limited by the activity of its mitochondrial or plasma membrane transporter. Limited citrate release at high fatty acid concentrations may have important consequences for the heart's fuel metabolism and function.

Key words: citric acid cycle; isotopomer analysis; cardiac energy metabolism

INTRODUCTION

Synthesized in the mitochondria, citrate plays a central role in cardiac energy metabolism as an intermediate of the citric acid cycle (CAC). In addition, in the heart, as in other non-lipogenic tissues, it is proposed that cytosolic citrate could regulate substrate fuel selection, restricting glucose utilization by inhibiting glycolysis at the level of phosphofructokinase and long-chain fatty acid (LCFA) β -oxidation after its conversion to malonyl-CoA, an inhibitor of carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) (13, 32, 35). The regulatory role of cytosolic citrate in the heart has, however, been controversial because of the low activity of its mitochondrial citrate transporter (9, 39), whose participation is necessary for citrate transfer from the mitochondria to the cytosol. A better understanding of factors regulating cardiac citrate release might explain why patients suffering from cardiac diseases show a modified substrate oxidation profile associated with greater citrate and lactate release rates (47, 48). Furthermore, it may suggest interventions that favor the conversion of cytosolic citrate to malonyl-CoA and hence inhibit LCFA β -oxidation. A number of studies have underlined the benefit of shifting the heart's preference from fatty acid to carbohydrate use for improved cardiac efficiency in the setting of ischemia (37, 40).

Over the past years, we conducted a series of studies using ^{13}C -labeled substrates and isotopomer analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) in which we assessed substrate fluxes through metabolic pathways related to citrate synthesis, utilization and release. These were achieved in various study models, namely, *ex vivo* Langendorff-perfused rat hearts (11, 12, 32, 49), *in situ* infused pig hearts (29, 30), and *ex vivo* work-performing rat hearts (50). Results that appear to support a potential metabolic link between anaplerotic pyruvate carboxylation, mitochondrial citrate efflux and cytosolic cleavage of citrate to malonyl-CoA can be summarized as follows. Rat hearts perfused *ex vivo*, in the Langendorff or working mode with ^{13}C -labeled substrates, constantly released small quantities of citrate (nmol) whose ^{13}C -labeling pattern reflected that of tissue citrate, suggesting that citrate release reflected its mitochondrial efflux (11, 12, 49, 50). The specificity of the process was supported by the lack of correlation between citrate release rates and indices of oxygen deprivation or cellular membrane damage, as well as the effect of the specific inhibitor of the citrate transporter, 1,2,3-benzene tricarboxylic acid (49, 50). Consistent with the activity of the

cardiac citrate transporter (9, 39), citrate release rates in the various study models and conditions ranged from 5 to 20 nmol·g⁻¹·min⁻¹ (12, 29, 30, 32, 49, 50), which are similar to those reported in humans (47). In the Langendorff-perfused rat heart, citrate release rates were modulated by the heart's energy demand, oxygen supply as well as by the nature and concentration of substrates supplied for citrate synthesis, namely, anaplerotic oxaloacetate (OAA) and acetyl-CoA. The magnitude and direction of the changes observed were in agreement with a regulatory role for cytosolic citrate in fuel partitioning (49). They were also sufficient to support the measured increase in tissue malonyl-CoA levels induced by changes in substrate supply, at most 0.7 nmol/min (32). Citrate release rates were augmented in work-performing spontaneously hypertensive rat hearts, an animal model of cardiac hypertrophy, compared to Wistar-Kyoto control hearts (50). In pig hearts infused *in situ*, however, citrate release rates were not enhanced by increased substrate supply (30). They were, however, reduced under low-flow ischemic conditions mimicking hibernation concomitantly with flux through anaplerotic pyruvate carboxylation and the CAC (29), while citrate tissue levels remained constant. These results suggested a fine inter-regulation between cardiac citrate efflux and anaplerosis in maintaining citrate pool size.

This study was undertaken to expand our understanding of the afore-mentioned potential interregulation among pathways involved in cardiac citrate synthesis and release. Furthermore, we aimed at specifically explaining why citrate release was modulated by substrate supply in the Langendorff-perfused rat heart (49), but not in the pig heart *in situ* (30). For this purpose, *ex vivo* work-performing hearts were perfused under normoxia with semi-recirculating buffer containing physiological concentrations of unlabeled (glucose 5.5 mM) and ¹³C-labeled (lactate 1 mM, pyruvate 0.2 mM, and LCFA-oleate 0.4 mM) substrates. We tested the impact of increasing fatty acid concentrations from 0.4 to 1 mM, respectively mimicking fed and fasting levels (28), with either the LCFA oleate or the medium-chain fatty acid (MCFA) octanoate. In contrast to oleate, octanoate β-oxidation is not regulated by CPT-I (38). In parallel to the continuous monitoring of indices of cardiac performance and cellular integrity, the following metabolic parameters related to citrate synthesis and release were documented: 1) the contribution of pyruvate decarboxylation and anaplerotic carboxylation, as well as fatty acid β-oxidation, to citrate synthesis, 2) citrate release rates and CAC intermediate tissue levels, and 3) the maximal tissue activities of

mitochondrial enzymes catalyzing citrate synthesis and utilization, namely, citrate synthase and aconitase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

The sources of chemicals, biological products, and ^{13}C -labeled substrates have been identified previously (11, 12, 20, 49). The albumin solution (BSA, fraction V, fatty acid-free (Intergen): 300 g of BSA in 1.5 liters of modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer without glucose but with 0.1 mM EDTA) was dialyzed in membranes (molecular weight cut-off 6,000 to 8,000) at 4°C against 25 liters of the same buffer for 28 h to reduce the background citrate concentration to the low micromolar range ($1.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$).

Heart perfusions in semi-recirculating working mode

Animal experiments were approved by the local animal care committee in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male Wistar rats (300-330 g; Charles River) were provided with food and water *ad libitum*. The following procedure for heart isolation and its *ex vivo* perfusion in the working mode has been described previously in detail (50). After anesthesia by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg), the hearts were cannulated rapidly and perfused retrogradely through the aorta at a constant pressure of 70 mmHg with semi-recirculating modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer containing (pH 7.4): 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μM carnitine, 1 mM lactate and 0.2 mM pyruvate. A 10-min perfusion period was allowed for the insertion of a polyethylene catheter (PE-50) through the pulmonary vein in the left ventricle. The PE tubing, pulled through the ventricular wall and anchored in the apex of the heart by a fluted end, was connected to a pressure transducer for continuous monitoring of left ventricular functions. The left atrium was then cannulated through the pulmonary vein. Spontaneously beating hearts were switched to the anterograde work-performing mode and perfused for 30 min through the left atrial cannula with semi-recirculating modified Krebs buffer (800 ml), after which they were freeze-clamped with aluminium tongs chilled in liquid N_2 . Aortic

afterload pressure was set at 80 mmHg. Atrial preload was monitored continuously by a pressure transducer (Digi-Med Blood Pressure Analyzer, Micro-Med) and maintained at 11.5 mmHg. The volume of air in the compliance chamber was fixed at 1.5 cm³, which represents 30% of its total volume. The following functional parameters were monitored continuously during the perfusion experiments: 1) atrial inflow and aortic outflow, with calibrated electromagnetic flow probes (Model FM501; Carolina Medical Electronics), 2) temperature, with a thermocouple, and 3) left ventricular contractile functions, namely, heart rate (HR), maximum left ventricular pressure (LVP_{max}), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and maximum value for the first derivative of LVP (+dP/dt_{max}), with a pressure transducer (Digi-Med Heart Performance Analyzer, Micro-Med). Free Ca²⁺, pO₂ and pCO₂, were measured in influent and coronary effluent perfusates collected on ice at 20 min with a blood gas, electrolyte and pH analyzer (ABL 77 series, Radiometer).

Perfusion Protocols

Wistar rat hearts were perfused under normoxia with semi-recirculating Krebs-Henseleit bicarbonate buffer containing 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM [U-¹³C₃]lactate, 0.2 mM [U-¹³C₃]pyruvate, 50 μM carnitine, 3% albumin, 0.1 mM EDTA, and either 1) 0.4 mM [1-¹³C]oleate (n = 8; *Group I: open bars*), 2) 1.0 mM [1-¹³C]oleate (n = 8; *Group II: grey bars*) or 3) 0.4 mM oleate and 0.6 mM [1-¹³C]octanoate (n = 6; *Group III: black bars*). We also conducted other sets (n = 5 in each group) of perfusion experiments with: 1) [1-¹³C]oleate or [U-¹³C₁₈]oleate (*Groups I and II*) or, 2) [1-¹³C]octanoate (*Group III*), as the only ¹³C-substrate, for methodological purposes (for details, see the section below on *Flux parameters*). All ¹³C-labeled substrates were supplied at 99% enrichment except for [U-¹³C₁₈]oleate, which was at 15% enrichment. The ionized calcium concentration of the albumin-containing buffer was determined to be 1.8 mM. The substrate concentrations in the perfusion buffer mimic those in plasma. LCFA concentrations of 0.4 mM and 1 mM mimic the fed and fasting states, respectively (28). Lactate and pyruvate were added in a physiological ratio to minimize perturbations of the cytosolic redox state that occur when lactate is supplied alone. The addition of carnitine compensates for its potential loss during heart isolation (34). We previously verified that a near isotopic steady-state is reached after 20-25 min of heart perfusion (50). Under all conditions, citrate release rates (25-30 min), lactate and pyruvate uptake and efflux rates (25-30 min), and lactate dehydrogenase release rates (LDH; 5,

15 and 25 min) were quantified from influent and coronary effluent perfusate samples collected on ice at the indicated times. ^{13}C -Enrichment, concentrations of the CAC intermediates (citrate, isocitrate, α -ketoglutarate (α -KG), succinate, fumarate, and malate), CAC enzyme activities (citrate synthase and aconitase) as well as flux ratios relevant to substrate selection for citrate synthesis, namely, pyruvate and fatty acids from ^{13}C -enrichment of the acetyl (carbons 4 and 5: C_{4+5}) and OAA ($\text{C}_{1+2+3+6}$) moiety of citrate, were measured in freeze-clamped powdered tissues.

Analytical procedures

Citrate release rates were quantitated by isotope-dilution GCMS and flow rate measurements (49). Tissue levels of CAC intermediates were determined in 100-mg tissue samples spiked with 10 nmol [$1,5\text{-}^{13}\text{C}_2$]citrate, 25 nmol [$1,4\text{-}^{13}\text{C}_2$]succinate, and 5 nmol [$\text{U-}^{13}\text{C}_4$]fumarate, and quantification was achieved with standard curves for isocitrate, α -KG, and malate. ^{13}C -Mass isotopomer distribution (MID) of CAC intermediates and related metabolites in heart tissue samples (citrate and its OAA moiety, α -KG, succinate, malate and pyruvate) were determined by GCMS assays (11, 12, 20, 49). Perfusate lactate concentrations, tissue citrate synthase and aconitase activities, and LDH release were quantified by enzymatic assay with a Roche Cobas Fara spectrophotometer (3, 10, 20, 49). Protein contents were measured with a Bio-Rad kit, and BSA served as the standard. Enzyme activities are expressed as units (U) per g of total protein, where 1 U of enzyme activity is defined as the amount catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate per min at 37°C . The ^{13}C -MIDs of lactate and pyruvate in influent and coronary effluent perfusates were determined after treatment with 1 M NaB^2H_4 (see below for details).

Myocardial oxygen consumption (MVO_2). MVO_2 ($\mu\text{mol}/\text{min}$) was calculated from the product of O_2 concentration (mM) differences between influent and effluent perfusates, coming out of the oxygenator and pulmonary artery, respectively, and the coronary flow rate (ml/min). A value of 1.06 mM was taken as the concentration of dissolved O_2 at 100% saturation (42).

Functional status. The rate pressure product (RPP) was calculated from the left ventricular developed pressure [LVP_{dev} (mmHg) = LVP_{max} (mmHg) - LVEDP (mmHg)] and HR: RPP (mmHg \cdot beats \cdot min $^{-1}$) = [LVP_{dev} (mmHg) \cdot HR (beats/min)]. Cardiac power [CP

(mW) = cardiac output (m^3/s) \cdot LVDP_{max} (Pa)] and cardiac efficiency [CE ($\text{mW}/\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) = CP (mW) / MVO₂ ($\mu\text{mol}/\text{min}$)] were calculated with a conversion factor of 133.32 Pa/mmHg. The factor for conversion of measured gram wet weight to gram dry weight was determined to be 8.85 ± 0.16 ($n = 29$).

Flux parameters. GCMS data are expressed as molar percent enrichment (MPE) as defined previously (11, 12, 20, 34, 49). Briefly, mass isotopomers of metabolites containing 1 to n ^{13}C -atoms were identified as M_i with $i = 1, 2, \dots, n$, and the absolute MPE of individual ^{13}C -labeled mass isotopomers (M_i) of a given metabolite was calculated as follows:

$$\text{MPE}(M_i) = \% A_{M_i} / [A_M + \Sigma A_{M_i}], \quad (1)$$

where A_M and A_{M_i} represent the peak areas from ion chromatograms corrected for natural abundance, corresponding to unlabeled (M) and ^{13}C -labeled (M_i) mass isotopomers, respectively. The development of equations to calculate flux ratios relevant to citrate synthesis in hearts perfused with [$\text{U}-^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) and [$1-^{13}\text{C}$]oleate or [$1-^{13}\text{C}$]octanoate has been described previously (11, 12, 49). Briefly, flux ratios were calculated from the measured MID of the following tissue metabolites: (i) citrate and its OAA moiety (OAA^{CIT}), from which we extrapolated the acetyl moiety of citrate (AC^{CIT}), (ii) pyruvate, and (iii) succinate. In this study, we reported the following flux rates, expressed relative to that of citrate synthase (CS): 1) oleate oxidation: $\text{OLE}/\text{CS} = 9 \cdot \text{M1 AC}^{\text{CIT}}/\text{M1 oleate}$ (with [$1-^{13}\text{C}$]oleate (99%); Eq. 3 of Ref. 49) or $\text{OLE}/\text{CS} = \text{M2 AC}^{\text{CIT}}/\text{M2 oleate}$ (with [$\text{U}-^{13}\text{C}_{18}$]oleate (15%)), 2) octanoate oxidation: $\text{OCT}/\text{CS} = 4 \cdot \text{M1 AC}^{\text{CIT}}/\text{M1 octanoate}$ (Eq. 6 of Ref. 11), 3) pyruvate decarboxylation: $\text{PDC}/\text{CS} = \text{M2 AC}^{\text{CIT}}/\text{M3 pyruvate}$ (Eq. 5 of Ref. 11), 4) pyruvate carboxylation: $\text{PC}/\text{CS} = \text{OAA}^{\text{CIT}}/\text{M3 pyruvate}$ (Eq. 4 of Ref. 11), and 5) the contribution of other substrates (OS), such as endogenous fatty acids and/or amino acids, to the formation of acetyl-CoA: $\text{OS}/\text{CS} = 1 - (\text{PDC}/\text{CS} + \text{FA}/\text{CS})$, where FA/CS refers to the fatty acid oxidation flux ratio OLE/CS or OCT/CS . The measured MPE M3 OAA^{CIT} was corrected for the fraction of M3 OAA molecules coming from citrate isotopomers metabolized in the CAC, as described in Ref. 11 (Eqs. 8-10).

To extrapolate the MPE M1 and M2 of AC^{CIT} from the measured MID of citrate and of its OAA moiety, we used different mathematical approaches that depended on the choice of ^{13}C -substrate(s) and/or perfusion conditions. For hearts perfused with $[U-^{13}C_3](\text{lactate} + \text{pyruvate})$ and $[1-^{13}C]\text{oleate}$ or $[1-^{13}C]\text{octanoate}$ (*Groups I-III*), we applied Eq. 2:

$$\text{MPE M2 } AC^{CIT} = 0.5 \cdot [\sum \text{MPE } (Mi \cdot i) (\text{citrate} - \text{OAA}^{CIT}) - \text{MPE M1 } AC^{CIT}] \quad (2)$$

In Eq. 2, the MPE M1 of AC^{CIT} resulting from oleate oxidation was measured in separate experiments in which $[1-^{13}C$ or $U-^{13}C_{18}]\text{oleate}$ was the only ^{13}C -substrate. These equations were used because the MPE values of AC^{CIT} calculated with Eqs. 18 and 19 of Ref. 11 were imprecise for perfusions under conditions where pyruvate carboxylation is substantial (*Group I*). This is explained by the fact that tissue citrate was highly enriched in isotopomers of higher masses (M4-M6), while Eqs. 18 and 19 are based solely on the MPE M1 and M2 of citrate and OAA^{CIT} (see Ref. 11 for details). For hearts perfused with $[1-^{13}C]\text{oleate}$, or $[U-^{13}C_{18}]\text{oleate}$, or $[1-^{13}C]\text{octanoate}$ as the sole ^{13}C -substrate, we employed Eqs 18-19 of Ref. 11. For *Groups II* and *III*, flux ratios calculated with Eqs 18-19 in perfusions with the mix of ^{13}C -substrates, lactate, pyruvate and a fatty acid did not differ from those calculated using Eq. 2, which necessitated additional perfusions with the ^{13}C -fatty acid as sole ^{13}C -substrate. Note that for *Groups I* and *II*, since similar oleate oxidation flux ratios were obtained with 0.4 or 1 mM $[1-^{13}C]\text{oleate}$ or $[U-^{13}C_{18}]\text{oleate}$, the results with these two ^{13}C -substrates were averaged.

Lactate and pyruvate uptake and efflux. Lactate and pyruvate uptake and efflux rates were determined by an adaptation of the nuclear magnetic resonance (NMR) approach described recently (50). In brief, in hearts perfused with a non-recirculating buffer containing unlabeled glucose and $[U-^{13}C_3](\text{lactate} + \text{pyruvate})$, lactate produced by glycolysis from exogenous glucose and endogenous glycogen is unlabeled (M) and can be distinguished by GCMS from $[U-^{13}C_3]\text{lactate}$ (M3) added to the buffer. The uptake of $^{13}C_3$ -labeled lactate is quantified from the difference between its influent and effluent perfusate concentration. In practice, the MID of perfusate lactate and pyruvate was determined by GCMS in samples treated with 1 M NaB^2H_4 . This treatment reduces pyruvate into lactate, and the 4 mass isotopomers of lactate obtained can be distinguished by GCMS: $^{12}C\text{-lactate} \rightarrow ^{12}C\text{-lactate}$ (M), $^{13}C\text{-lactate} \rightarrow ^{13}C\text{-lactate}$ (M3),

^{12}C -pyruvate \rightarrow ^{12}C -lactate deuterated (M1), and ^{13}C -pyruvate \rightarrow ^{13}C -lactate deuterated (M4). The concentrations of unlabeled (M, M1) and ^{13}C -labeled (M3, M4) lactate and pyruvate were calculated from their corresponding MIDs and enzymatically-determined perfusate lactate concentrations, which included both unlabeled (M) and ^{13}C -labeled lactate (M3). Efflux and uptake rates of lactate and pyruvate ($\mu\text{mol}/\text{min}$) were obtained by multiplying their perfusate concentrations in unlabeled (M, M1) and ^{13}C -labeled (M3, M4) ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) isotopomers respectively, by the coronary flow rate (ml/min).

Absolute CAC flux rate. The CAC flux rate was calculated from MVO_2 , and the stoichiometric relationships between oxygen consumption and citrate formation, from carbohydrates and fats. The equation of Panchal *et al.* (Eq. 3 of Ref. 30) was corrected and modified (W.C. Stanley, personal communication) to take into account: 1) the specific contribution of exogenous oleate or octanoate to citrate formation as assessed from the flux ratios OLE/CS or OCT/CS, 2) the contribution of other sources as assessed from the flux ratio OS/CS, which we assumed to be endogenous triglyceride stores consisting of equal proportions of oleate and palmitate (*Groups I and II*), or exogenously-supplied oleate (*Group III*), and 3) the fact that glucose forms $0.333 \mu\text{mol}$ of citrate per μmol of O_2 consumed instead of 0.6 as assumed previously in Panchal *et al.* That is, for *Groups I and II*, we used Eq. 3 below, which considers that $1 \mu\text{mol}$ of consumed O_2 results in the formation of 0.333, 0.353, and $0.348 \mu\text{mol}$ of citrate from carbohydrates (glucose, lactate and pyruvate), oleate and palmitate, respectively. For *Group III*, where hearts were perfused with the mix of oleate/octanoate, we used Eq. 3a, which considers that octanoate forms $0.364 \mu\text{mol}$ of citrate per μmol of O_2 consumed.

$$\text{CAC flux} = \text{MVO}_2[(\text{PDC}/\text{CS} \cdot 0.333) + (\text{OLE}/\text{CS} \cdot 0.353) + (\text{OS}/\text{CS} \cdot 0.351)] \quad (3)$$

$$\text{CAC flux} = \text{MVO}_2[(\text{PDC}/\text{CS} \cdot 0.333) + (\text{OCT}/\text{CS} \cdot 0.364) + (\text{OS}/\text{CS} \cdot 0.353)] \quad (3a)$$

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SE of $n = 5-15$ heart perfusions, and are compared to those obtained for *Group I*, which we refer to as the control condition. One-way ANOVA followed by a Bonferroni selected-comparison test was applied for statistical evaluation of the data. A probability of $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Functional and physiological parameters

The values of the functional and physiological parameters measured throughout the working heart perfusion experiments in the presence of various substrate mixtures are presented in Table 1. Under all conditions examined, these parameters remained constant for the entire 30-min perfusion period. HR was stable without recurring to pacing. LDH release rates, an index of cellular necrosis, were low (< 0.2 U/min) compared to values observed following an ischemic insult (5). Compared to the control condition, in which hearts were perfused in the presence of 0.4 mM oleate (*Group I*), hearts perfused with 1 mM fatty acids, either oleate (*Group II*) or a mixture of oleate and octanoate (*Group III*), showed 1) significantly lower values for cardiac output, aortic flow and CE, 2) slightly lower, though not significantly different, values for RPP, LVP_{dev} , and coronary flow rates, and 3) similar values for HR and MVO_2 . As a whole, a similar trend was observed for all parameters whether the hearts were perfused with 1 mM oleate alone or with oleate/octanoate. However, some small differences did reach significance for only one of these conditions. pHi was significantly lower for hearts perfused with 1 mM oleate, and CP, for hearts perfused with oleate/octanoate.

Table 1. Effects of fatty acids on the functional and physiological parameters of perfused working rat hearts

| Parameters | Perfusion groups | | |
|---|------------------|---------------|--------------|
| | <i>I</i> | <i>II</i> | <i>III</i> |
| HR (beats/min) | 259 ± 9 | 261 ± 9 | 266 ± 11 |
| Cardiac output (ml/min) | 49 ± 2 | 41 ± 2 * | 40 ± 3 ** |
| Aortic flow (ml/min) | 31 ± 2 | 24 ± 1 * | 23 ± 2 ** |
| Coronary flow (ml/min) | 18 ± 1 | 17 ± 1 | 16 ± 1 |
| RPP (mmHg·beats·min ⁻¹ ·10 ⁻³) | 35.2 ± 1.2 | 34.8 ± 1.3 | 33.2 ± 1.9 |
| LDH (mU/min) | 178 ± 17 | 202 ± 22 | 143 ± 22 |
| LVP_{dev} (mmHg) | 137 ± 4 | 134 ± 4 | 127 ± 6 |
| MVO_2 (μmol/min) | 9.5 ± 0.5 | 9.1 ± 0.5 | 9.5 ± 0.4 |
| pHi | 7.37 ± 0.01 | 7.34 ± 0.01 * | 7.35 ± 0.01 |
| CP (mWatts) | 14.7 ± 1.0 | 11.3 ± 0.7 | 10.5 ± 1.1 * |
| CE (mWatts/μmol·min ⁻¹) | 1.7 ± 0.2 | 1.2 ± 0.1 * | 1.3 ± 0.1 * |

Data are means \pm SE of 7-15 heart perfusion experiments. Hearts were perfused with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 50 μ M carnitine, 3% albumin, 0.1 mM EDTA, and 1) 0.4 mM oleate (*Group I*) or 2) 1.0 mM oleate (*Group II*) or 3) 0.4 mM oleate and 0.6 mM octanoate (*Group III*). Heart rate (HR), cardiac flows, rate pressure product (RPP), and left ventricular developed pressure (LVP_{dev}), monitored throughout the perfusion experiments, were averaged for the entire 0-30-min period. Lactate dehydrogenase (LDH) release was measured in effluent perfusates and averaged for samples collected at 5, 15, and 25 min. Myocardial oxygen consumption (MVO₂) and pHi were calculated from pO₂ and pCO₂ values determined in influent and effluent perfusates collected at 20 min. CP, cardiac power; CE, cardiac efficiency. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. *Group I*.

¹³C-enrichment and flux data relevant to citrate synthesis

Table 2 reports the MIDs of CAC intermediates isolated from Wistar rat hearts perfused with [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) and [1-¹³C]oleate or [1-¹³C]octanoate. From these ¹³C-enrichment data, we emphasize the following points. Firstly, for hearts perfused with 0.4 mM oleate (*Group I*), tissue CAC intermediates were highly enriched in isotopomers of higher masses (M4, M5, M6), which is typical for hearts perfused with [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) under conditions of substantial pyruvate decarboxylation. Secondly, for hearts perfused with 1 mM fatty acids (*Groups II* and *III*), tissue CAC intermediates showed their highest ¹³C-enrichments in M1 isotopomers, resulting from increased [1-¹³C]fatty acid oxidation. Finally, the MID of malate was similar to that of fumarate (data not shown), reflecting rapid equilibration by fumarase (12).

Table 2. ¹³C-Labeling of CAC intermediates isolated from working Wistar rat hearts perfused with [U-¹³C₃]pyruvate, [U-¹³C₃]lactate, and [1-¹³C]fatty acid

| Metabolites | Groups | MPE (%) | | | | | | ΣMi |
|--------------|------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| | | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | |
| Citrate | <i>I</i> | 14.0 \pm 0.8 | 19.8 \pm 0.6 | 18.6 \pm 0.6 | 13.6 \pm 1.0 | 8.7 \pm 1.1 | 3.3 \pm 0.6 | 78.0 \pm 2.0 |
| | <i>II</i> | 21.4 \pm 0.9 ^E | 17.0 \pm 1.7 | 8.9 \pm 1.7 ^E | 3.8 \pm 1.1 ^E | 1.5 \pm 0.6 ^E | 0.3 \pm 0.1 ^E | 52.8 \pm 4.5 ^E |
| | <i>III</i> | 27.6 \pm 0.8 ^E | 17.0 \pm 0.9 | 8.8 \pm 0.9 ^E | 3.2 \pm 0.6 ^E | 0.9 \pm 0.2 ^E | 0.1 \pm 0.0 ^E | 57.5 \pm 1.8 ^E |
| α -KG | <i>I</i> | 14.5 \pm 0.9 | 22.1 \pm 0.4 | 18.1 \pm 1.1 | 12.1 \pm 1.1 | 7.8 \pm 1.3 | | 74.7 \pm 2.2 |
| | <i>II</i> | 19.0 \pm 0.6 ^{**} | 16.4 \pm 1.9 ^{**} | 6.9 \pm 1.6 ^E | 2.8 \pm 1.0 ^E | 0.9 \pm 0.5 ^E | | 46.1 \pm 4.8 ^E |
| | <i>III</i> | 27.2 \pm 0.6 ^E | 15.6 \pm 0.7 ^E | 6.0 \pm 0.6 ^E | 2.0 \pm 0.7 ^E | 0.4 \pm 0.1 ^E | | 51.1 \pm 1.2 ^E |
| Succinate | <i>I</i> | 17.9 \pm 1.1 | 18.5 \pm 1.2 | 16.0 \pm 1.5 | 8.4 \pm 1.4 | | | 60.8 \pm 4.7 |
| | <i>II</i> | 17.9 \pm 1.0 | 12.3 \pm 1.1 ^{**} | 5.6 \pm 1.3 ^E | 1.4 \pm 0.6 ^E | | | 37.3 \pm 3.0 ^{**} |
| | <i>III</i> | 21.3 \pm 0.9 | 11.5 \pm 1.4 ^{**} | 3.7 \pm 0.9 ^E | 0.5 \pm 0.2 ^E | | | 37.1 \pm 3.3 ^{**} |
| Malate | <i>I</i> | 20.7 \pm 0.7 | 19.5 \pm 0.3 | 17.4 \pm 1.0 | 9.0 \pm 1.2 | | | 66.7 \pm 2.0 |
| | <i>II</i> | 20.7 \pm 0.9 | 13.9 \pm 1.6 ^{**} | 7.0 \pm 1.5 ^E | 0.4 \pm 0.8 ^E | | | 42.0 \pm 4.2 ^E |
| | <i>III</i> | 25.0 \pm 0.2 ^E | 12.4 \pm 1.0 ^E | 5.7 \pm 0.6 ^E | 0.8 \pm 0.1 ^E | | | 43.8 \pm 1.9 ^E |

Data, expressed as molar percent enrichment (MPE), are means \pm SE of 5-8 heart perfusion experiments, as described for Table 1. Freeze-clamped hearts were processed for analysis of the ^{13}C -labeling of citric acid cycle (CAC) intermediates by GCMS. ** $P < 0.01$, $^{\text{E}}$ $P < 0.001$ vs. Group I.

Table 3 reports the MPE values for tissue pyruvate and for the acetyl and OAA moieties of tissue citrate, and Figure 1 depicts the various flux parameters calculated from these MPE values for all perfusion groups. From the MPE of tissue pyruvate in M3 isotopomers, we conclude that under all conditions examined, $\sim 70\%$ of tissue pyruvate arose from exogenously-supplied pyruvate and/or lactate, and the remaining $\sim 30\%$ arose from exogenously-supplied glucose and/or endogenous glycogen. These data concur with those of Lloyd *et al.* (23) in emphasizing the importance of exogenous lactate and pyruvate as energy substrates. Note that tissue pyruvate was not enriched in M1 or M2 isotopomers (data not shown), indicating negligible decarboxylation of malate to pyruvate through the malic enzyme reaction (12, 30, 49, 50). There were significant changes in the MPEs M1 and M2 of the acetyl moiety of citrate between hearts perfused with 0.4 mM oleate and 1 mM fatty acids, clearly indicating that the sources of acetyl units for citrate formation differed greatly between these perfusion groups.

Table 3. ^{13}C -Enrichments of pyruvate and of the acetyl and OAA moieties of citrate isolated from working rat hearts perfused with [U- $^{13}\text{C}_3$]pyruvate, [U- $^{13}\text{C}_3$]lactate, and [1- ^{13}C]fatty acid

| MPE Values | Perfusion groups | | |
|--|------------------|--------------------|--------------------|
| | I | II | III |
| MPE pyruvate: (M3) | 66.4 \pm 1.8 | 69.4 \pm 1.5 | 70.4 \pm 1.2 |
| MPE AC ^{CIT} : (M1) | 2.1 \pm 0.2 | 7.6 \pm 0.8 *** | 19.9 \pm 0.6 *** |
| MPE AC ^{CIT} : (M2) | 43.6 \pm 4.7 | 13.4 \pm 2.3 *** | 8.5 \pm 1.0 *** |
| MPE OAA ^{CIT} _{measured} : (M3) | 18.0 \pm 1.5 | 6.4 \pm 1.5 *** | 5.4 \pm 0.6 *** |
| MPE OAA ^{CIT} _{corrected} : (M3) | 5.7 \pm 1.2 | 2.8 \pm 0.8 | 2.9 \pm 0.2 |

Data are means \pm SE of 5-8 heart perfusion experiments, as described in Table 1. The molar percent enrichment (MPE) M1 and M2 of the acetyl moiety of citrate (C_{4+5} ; AC^{CIT}) were extrapolated from the measured mass isotopomer distribution (MID) of citrate and its oxaloacetate (OAA) moiety ($\text{C}_{1+2+3+6}$; OAA^{CIT}). The MPE M3 of OAA^{CIT} was corrected for the formation of M3 OAA from CAC metabolism of citrate isotopomers (see Experimental Procedures). *** $P < 0.001$ vs. Group I.

From the flux parameters (Figure 1), we conclude that pyruvate decarboxylation (PDC/CS) represented the predominant source of acetyl-CoA for citrate synthesis under the control condition (Fig. 1A; 0.66 ± 0.06 for PDC/CS versus 0.22 ± 0.07 for OLE/CS). Raising fatty acid concentrations from 0.4 to 1 mM by the addition of 0.6 mM oleate or 0.6 mM octanoate significantly reduced by more than 70% the contribution of pyruvate decarboxylation to citrate synthesis, while that of exogenous fatty acid β -oxidation was increased more than 3-fold. Note that in the latter condition, octanoate represented by far the major fatty acid source of acetyl-CoA, a finding that concurs with the notion that its β -oxidation is not regulated at CPT-I. As evaluated from the flux ratio OS/CS, the percentage of acetyl-CoA that could arise from the β -oxidation of exogenous oleate in hearts perfused with the oleate/octanoate mix would be at most $8 \pm 1\%$. The inhibition of exogenous oleate β -oxidation by octanoate concurs with its capacity to increase tissue levels of the CPT-I inhibitor malonyl-CoA (24, 32). The relative contribution of other substrates to acetyl-CoA formation was low, and did not differ significantly between perfusion groups (OS/CS = 0.08-0.16).

Figure 1 also reports the rates of pyruvate carboxylation, an anaplerotic reaction, expressed relative to that of the citrate synthase reaction (PC/CS; Fig. 1B) or the pyruvate decarboxylation reaction (PC/PDC; Fig. 1C). From the PC/CS flux ratio, we conclude that this reaction generated $\sim 10\%$ of OAA for citrate synthesis when the hearts were perfused with 0.4 mM oleate (*Group I*), but its contribution was reduced significantly by $\sim 60\%$ in hearts perfused with 1 mM fatty acids consisting of oleate (*Group II*) or oleate/octanoate (*Group III*). The carboxylation of pyruvate represented about $\sim 20\%$ of its decarboxylation in hearts perfused with 0.4 mM oleate. Pyruvate partitioning between carboxylation and decarboxylation was not affected by the addition of 0.6 mM oleate, but the PC/PDC flux ratio was increased ~ 2 -fold following the addition of 0.6 mM octanoate. There appears to be little, if any, entry of unlabeled carbon through anaplerosis at site(s) other than pyruvate carboxylation, as suggested by the dilution factors calculated (Eq. 10 of Ref. 11: *Group I*: 1.17 ± 0.08 ; *II*: 0.98 ± 0.05 ; and *III*: 1.01 ± 0.04 ; NS).

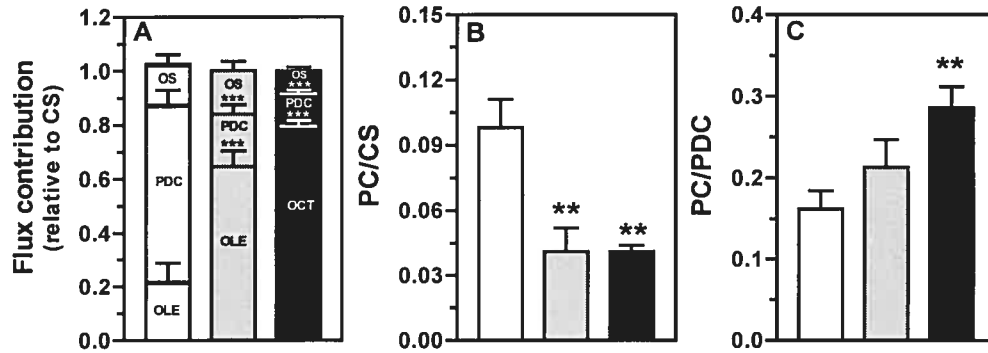


Figure 1. Effects of fatty acids on flux parameters relevant to citrate synthesis

Data are means \pm SE of 5-8 heart perfusion experiments, as described in Table 1. Bar codes for the perfusion groups are: *Group I*, open bars; *Group II*, grey bars; and *Group III*, solid bars. Flux values are calculated from the measured mass isotopomer distribution (MID) of the following tissue metabolites: (i) citrate and its OAA moiety ($C_{1+2+3+6}$; OAA^{CIT}), from which we extrapolate the acetyl moiety of citrate (C_{4+5} ; AC^{CIT}), (ii) pyruvate, and (iii) succinate. **A & B:** Flux values are expressed relative to citrate synthase (CS). **A:** (i) Fatty acid oxidation (FA/CS): oleate oxidation (OLE/CS: *Groups I* and *II*); and octanoate oxidation (OCT/CS: *Group III*); (ii) pyruvate decarboxylation (PDC/CS), (iii) other sources (OS/CS). **B:** Pyruvate carboxylation (PC/CS). **C:** PC flux is expressed relative to PDC (PC/PDC). ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. *Group I*.

Absolute flux rates for CAC, PDC and PC were calculated from MVO_2 values using Eq. 3 (*Groups I* and *II*) and 3a (*Group III*). Note that this calculation assumes complete oxidation of the substrates. The CAC flux rate, $\sim 3 \mu\text{mol}/\text{min}$, did not differ significantly between perfusion groups ($\mu\text{mol}/\text{min}$: *Group I*: 3.2 ± 0.3 ; *II*: 2.9 ± 0.1 ; *III*: 3.6 ± 0.2). The calculated absolute flux rates for fatty acid β -oxidation (μmol fatty acid oxidized/min: *Group I* - oleate: 0.080 ± 0.005 ; *Group II* - oleate: 0.203 ± 0.009 ; *Group III* - octanoate: 0.709 ± 0.033) are within the range of reported values for similarly perfused working rat hearts (24). The calculated absolute flux rates for pyruvate decarboxylation ($\mu\text{mol}/\text{min}$: *Group I*: 2.2 ± 0.3 ; *II*: $0.6 \pm 0.1^{***}$; *III*: $0.4 \pm 0.1^{***}$; *** $P < 0.001$ vs. *Group I*) and carboxylation ($\mu\text{mol}/\text{min}$: *Group I*: 0.31 ± 0.04 ; *II*: $0.12 \pm 0.04^{**}$; *III*: $0.14 \pm 0.01^{**}$; ** $P < 0.01$ vs. *Group I*) as well as their reduction by high fatty acid concentrations were in agreement with the measured rates of lactate plus pyruvate uptake. These rates, which were assessed from the concentrations of unlabeled and ^{13}C -labeled lactate and pyruvate in influent and effluent perfusates, and coronary flow rate measurements, are shown in Figure 2. As reported previously (50), perfused rat hearts also constantly released unlabeled lactate, presumably reflecting glycolysis from exogenous glucose or endogenous glycogen, which is depicted in Figure 2 as lactate efflux rates.

Increasing the fatty acid concentration from 0.4 to 1 mM with either oleate or octanoate decreased both lactate and pyruvate uptake [^{13}C] and efflux [^{12}C] rates, although most of these changes did not reach significance. Note that although lactate and pyruvate were supplied at the physiological ratio of 5, lactate and pyruvate uptake rates differed only by a factor of 2.5 or less, indicating preferential pyruvate uptake, in agreement with the data of Lloyd *et al.* (23). This was most apparent when the hearts were perfused with 1 mM oleate, where there was little, if any, lactate uptake. The ratio of lactate-to-pyruvate efflux, an index of the cytosolic redox state, was also greater at 1 mM than at 0.4 mM fatty acids, the greatest increase being observed with 1 mM oleate (Group I: 5.8 ± 0.6 ; II: $10.8 \pm 0.8^{***}$; III: $8.5 \pm 0.5^{**}$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.01$ vs. Group I).

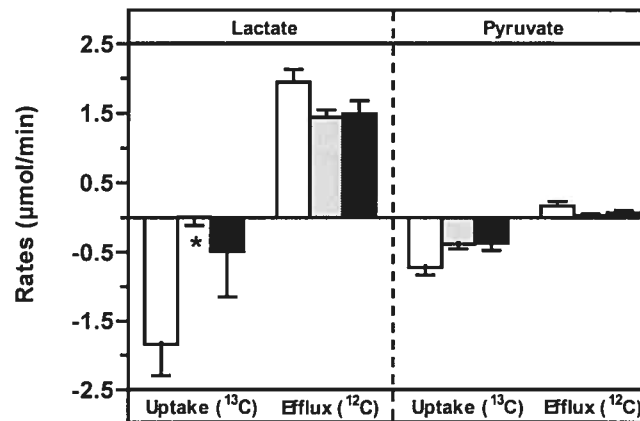


Figure 2. Effects of fatty acids on lactate and pyruvate uptake and efflux rates

Data are means \pm SE of 5-8 heart perfusion experiments, as described in Table I. Bar codes for the perfusion groups are as in Figure 1. Lactate and pyruvate uptake [^{13}C] and efflux [^{12}C] rates were calculated from the product of their concentration differences in influent and effluent perfusates and coronary flow rates. * $P < 0.05$ vs. Group I.

CAC intermediate concentrations, enzyme activities and citrate release rates

Figure 3 depicts the tissue concentrations of citrate and other CAC intermediates as well as the total pool size of CAC intermediates for all perfusion groups. When compared to the control condition (Group I), the addition of 0.6 mM oleate (Group II) or 0.6 mM octanoate (Group III) significantly increased tissue citrate and isocitrate levels (Fig. 3A) as well as the total pool size of CAC intermediates (Fig. 3B). With the addition of 0.6 mM octanoate, not only were the observed changes of greater magnitude, but the tissue levels of α -KG, fumarate and malate were also elevated. Note that under all

conditions examined, the tissue levels of isocitrate represented ~1% of citrate, which was lower than that found at equilibrium for the aconitase reaction *in vitro* (4-6%; see Ref. 27). The tissue concentrations of succinate, an index of oxygen deprivation, were also similar. The activities of enzymes responsible for citrate synthesis and utilization, namely, citrate synthase and aconitase, did not differ significantly between the perfusion groups. The activity of citrate synthase averaged 2.0 ± 0.1 U/mg protein, while that of aconitase was > 10-fold lower, averaging 0.15 ± 0.01 U/mg protein.

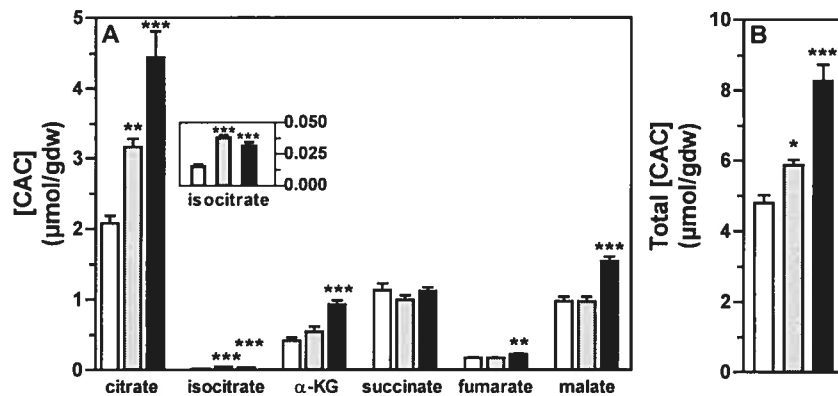


Figure 3. Effects of fatty acids on citric acid cycle (CAC) intermediate tissue concentrations (A), and total CAC intermediate tissue concentrations (B)

Data are means \pm SE of 8-11 heart perfusion experiments, as described in Table 1. Bar codes for the perfusion groups are as in Figure 1. Tissue levels of CAC intermediates were quantitated by GCMS in tissue homogenates spiked with standards. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. Group I.

Citrate release rates were similar for all perfusion groups and ranged from 11 to 14 nmol/min (Fig. 4A), which represented 0.3-0.5% of CAC flux rates. These rates represented <17% of those through the pyruvate carboxylation reaction (Fig. 4B), indicating that cardiac citrate efflux was well compensated by anaplerosis. In hearts perfused with 1 mM oleate (Group II), however, citrate release rates represented a significantly greater percentage of anaplerosis than in the other conditions (Groups I and III).

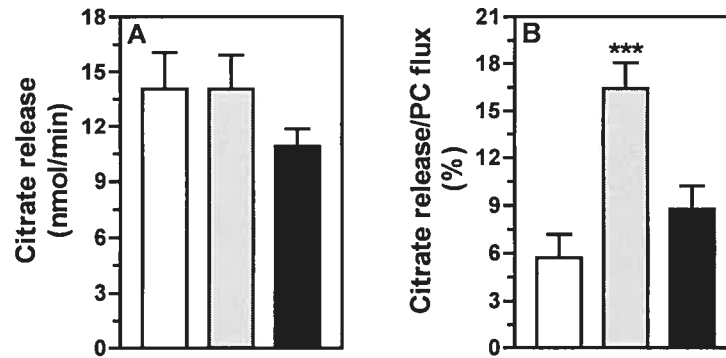


Figure 4. Effect of fatty acids on citrate release rates

Data are means \pm SE of 7-11 heart perfusion experiments, as described in Table 1. Bar codes for the perfusion groups are as in Figure 1. Citrate release rates were quantified in effluent perfusate samples, collected between 25 and 30 min, by isotope dilution GCMS and flow rate measurements. Citrate release rates are expressed in nmol/min (A) and relative to the absolute rate of anaplerotic pyruvate carboxylation (B). *** $P < 0.001$ vs. Group I.

DISCUSSION

This study focuses on the regulation of metabolic pathways linked to citrate synthesis and release in the heart. Specifically, it expands on our previous finding of citrate release modulated by substrate supply in Langendorff perfused hearts (49) and clarifies why this modulation was not observed in the pig heart *in situ* (30). We used the *ex vivo* work-performing perfused rat heart as our study model because of its greater relevance to the physiological situation with respect to workload. The advantages and limitations of our study model and ^{13}C -methods have been discussed previously in detail (10-12, 20, 29, 30, 49, 50). Hearts were perfused under normoxia with a mixture of substrates mimicking the *in situ* milieu, namely, glucose, insulin, lactate, pyruvate and the LCFA oleate. In our study model, raising fatty acid concentrations resulted in the expected shift in the contribution of fatty acid β -oxidation (enhanced > 3 -fold) and pyruvate decarboxylation (reduced ~ 3 -fold) to the formation of acetyl-CoA for citrate synthesis. These effects of fatty acids concur with previous reports (25, 33, 40). The inhibitory effects of fatty acids on pyruvate oxidation were also associated with a lowering of lactate and pyruvate uptake and efflux rates, as reported previously by Chatham *et al.* (7).

The impact of fatty acids on the anaplerotic flux of pyruvate carboxylation has not been examined previously under physiologically relevant conditions. Unexpectedly, our

results clearly demonstrated a 2.4-fold lowering of the contribution of pyruvate carboxylation for citrate synthesis when the exogenous fatty acid concentration was increased from 0.4 to 1 mM. This finding may explain why in studies of the pig heart *in situ*, where plasma fatty acid concentrations were set at > 0.6 mM by infusing Intralipid, alone, or with octanoate, the PC/CS flux was only $4.7 \pm 0.3\%$, and pyruvate addition did not elicit a rise in relative flux through pyruvate carboxylation under normoxia (30) or under ischemia mimicking hibernation (29). Clearly, more work is necessary to assess the significance of anaplerotic intervention with pyruvate at high fatty acid concentrations, as well as to identify the mechanism by which high fatty acid concentrations inhibit flux through pyruvate carboxylation. This will require designing an isotopic protocol to evaluate the relative contributions of pyruvate carboxylase and NADP⁺-linked malic enzyme, since the 2 enzymes are differentially regulated by several metabolites (acetyl-CoA, malonyl-CoA, pyruvate, malate, glutamate, fumarate, succinate) (14, 16, 19, 29, 31, 36, 41, 45, 46). From our literature search, the only plausible candidate to explain our data appears to be acetyl-CoA. While pyruvate carboxylase activity is stimulated at low concentrations of acetyl-CoA (20-200 μM), its activity is inhibited at concentrations > 200 μM , which could prevail at high fatty acid concentrations (14). Note that we excluded the inhibition of pyruvate carboxylase by glutamate (19), since the tissue levels of glutamate were similar under all perfusion conditions, averaging 0.85 ± 0.01 mmol/gdw (data not shown).

Let us now consider the effects of fatty acid concentrations on the heart's citrate tissue levels and release rates. Despite a 2-fold decrease in flux through anaplerotic pyruvate carboxylation, citrate tissue levels as well as total CAC pool size were increased several-fold at 1 mM fatty acids. The magnitude and type of changes depended on the nature of the fatty acid added: the changes were of greater magnitude, and more CAC intermediates showed a significant increase in their tissue levels with octanoate (*Group III*), consistent with previous reports (10, 30). The greater tissue citrate accumulation in hearts perfused with 1 mM fatty acids, combined with the high concentration ratios of citrate to isocitrate (~100-fold) and to α -KG (5-fold), suggest a greater imbalance or mismatch between citrate synthesis and utilization rates. This imbalance cannot be explained by changes in the maximal tissue activities of enzymes involved in these reactions, citrate synthase and aconitase, nor by changes in absolute CAC flux rates, which were similar under all conditions examined. The rise in tissue citrate levels of

hearts perfused with 1 mM fatty acid was not associated with a parallel increase in the citrate release rates. These results concur with those obtained in the pig heart *in situ* (30). Although they appear to argue against our previous data obtained in Langendorff-perfused rat hearts, which showed modulation of citrate release by substrate supply (49), this apparent discrepancy can be explained by major differences in perfusion protocols between these two studies. In our previous investigation, except for one condition, the hearts were perfused in the absence of albumin and LCFA, and citrate release rates were modulated in response to drastic changes in substrate supply, such as the removal of lactate plus pyruvate or decreasing the concentrations of octanoate from 0.2 to 0.02 mM. In contrast, in this study, the hearts were perfused with physiological concentrations of glucose, lactate, pyruvate and LCFA, as our control condition, and fatty acid concentration was raised from 0.4 to 1 mM by the addition of oleate or octanoate. In fact, irrespective of the mode of perfusion (Langendorff or working mode), citrate release rates reached similar maximal values (14-20 nmol/min) when hearts were supplied with a mixture of substrates mimicking the *in situ* milieu.

We interpret our results on citrate release in the perfused working rat heart, which concur with those in the pig heart *in situ*, as suggesting that under physiological conditions, citrate release rates are maximal. The rates could be limited by the activity of the mitochondrial and/or plasma membrane citrate transporter. We cannot distinguish between these possibilities, since measured rates may underestimate mitochondrial citrate efflux because of citrate metabolism in the cytosol by ATP-citrate lyase. In the heart, mitochondrial citrate transport is unidirectional (8, 9). Thus, cytosolic citrate has no known metabolic fate other than cleavage or efflux at the level of the plasma membrane. ATP-citrate lyase shows an activity of 0.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gww}$ in heart tissue (1), which is <10-fold greater than that of the mitochondrial citrate transporter. Its participation in the generation of acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis is supported by the results of our recent study (32). Little is known about the regulation of myocardial ATP-citrate lyase. Potentially, its activity could be restricted by the low level of CoA resulting from LCFA activation (9). Hence, proportionally more cytosolic citrate should be cleaved to OAA and acetyl-CoA in hearts perfused with 0.4 mM oleate plus 0.6 mM octanoate than with 1 mM oleate. In support of this possibility are the differential changes observed under these 2 perfusion conditions in tissue: (i) malate levels (i.e. increased with 1 mM oleate/octanoate) and (ii) pHi (i.e. decreased

with 1 mM oleate), as well as (iii) the ratio of lactate-to-pyruvate released or taken up by the heart, an index of the cytosolic NADH/NAD⁺ ratio (1 mM oleate > 1 mM oleate/octanoate). These effects would concur with the potential metabolic benefit of greater cleavage of cytosolic citrate to OAA followed by reduction to malate, namely, the oxidation of cytosolic NADH combined with proton (H⁺) consumption. An additional benefit would be the recycling of anaplerotic malate via the mitochondrial citrate transporter, which could compensate for decreased flux through pyruvate carboxylation. Additional studies are, however, necessary to substantiate these explanations. The differential effects could be of clinical relevance because substitution of LCFA with short/MCFA in the diet prevents the development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (17).

What is the significance of restricted cardiac citrate release? Limited release would appear advantageous under conditions of limited substrate supply, in view of the crucial role of citrate in energy metabolism. Could there be, however, some detrimental consequences linked to limited cardiac citrate release under conditions of substrate abundance? In our previous study, we found that blocking mitochondrial citrate efflux with 1,2,3-benzenetricarboxylic acid resulted in increased LDH release, indicating a potential adverse effect on membrane integrity (49). Could restricted citrate release contribute to tissue citrate accumulation? Interestingly, the difference in tissue citrate levels between hearts perfused for 30 min with 0.4 and 1 mM fatty acids amounts to 1.1 and 2.4 $\mu\text{mol/gdw}$. This is equivalent to accumulation rates of 5 and 15 nmol of citrate per min, which is in the range of measured values for citrate release rates. That citrate accumulates, at least in part, in the cytosol, and has the expected inhibitory effect on phosphofructokinase, is suggested by measured indirect estimates of glycolytic flux, namely the release rate of unlabeled lactate and tissue MPE M3 pyruvate (1-MPE M3 pyruvate = glucose contribution to tissue pyruvate). Both values showed a similar trend, supporting a lower glycolytic rate at 1 mM compared to 0.4 mM fatty acids, though the difference did not reach significance. Further work should, however, substantiate these findings, using [U-¹³C₆]glucose to provide a direct and more precise quantitation of glycolytic flux. Nevertheless, these considerations raise the question: Could the enhanced citrate release by diseased hearts (50) be part of an adaptive mechanism to prevent citrate accumulation and, hence, enable the heart to maintain a higher glycolytic rate that is crucial for pump function (51)? This appears to

be especially relevant in cardiac patients when LCFA concentrations are chronically elevated (~1mM). Under these conditions, restriction of cytosolic citrate cleavage may result in sustained accumulation of cytosolic citrate and/or in additional effects such as a reduction of the redox state (i.e., higher NADH/NAD⁺) and/or pH. The detrimental consequences of H⁺ accumulation in association with high LCFA concentrations on the heart's performance, especially following ischemia, include inhibition of contractile proteins and calcium overload (see Ref. 37 for review). Interestingly, the participation of cytosolic ATP-citrate lyase and malate dehydrogenase in a redox shuttle has been proposed in β -cells, where its would be implicated in glucose-induced insulin secretion (15).

With regards to the potential consequences of high fatty acid concentrations on cardiac performance, an interesting peripheral finding of this study was that high fatty acids lowered cardiac output and efficiency (CE) with unaltered O₂ consumption. This finding concurs with the notion that the heart's contractile performance at a given MVO₂, referred to as CE, is worse when it is oxidizing more fatty acids in lieu of glucose and lactate (for review, see Ref. 40). However, in most studies (6, 18, 21, 26) but not all (4), MVO₂ was increased at high fatty acids. Thus, the effects of fatty acids on cardiac efficiency could be attributed to either the theoretical 11% lower ATP yield per oxygen consumed during oxidation of fatty acids compared to carbohydrates (43), or to an uncoupling or ATP wasting effect of fatty acids (4, 18). Further work appears warranted to explain how high fatty acids can lower cardiac output and efficiency without change in MVO₂ and also to clarify the potential link between the metabolic and functional effects of fatty acids. A direct effect of fatty acids on the hemodynamics of the isolated, denervated, heart perfused *ex vivo*, appears not unlikely given the capacity of fatty acids modulate sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels (22) or to impair endothelium-dependent dilation via nitric oxide (43). *In vivo*, the situation differs since any direct actions of fatty acids on the heart would be counterbalanced by the response of the sympathetic and parasympathetic systems and may explain the increase in MVO₂ by fatty acids (2, 18, 21, 44).

In conclusion, this study, conducted in the working rat heart perfused with a substrate mixture mimicking the *in situ* milieu, expands on our knowledge of the functional and metabolic effects of high fatty acid concentrations in the heart. At the functional level,

increasing the fatty acid concentration from 0.4 to 1 mM resulted in a lowering of cardiac output and efficiency with unaltered O₂ consumption. At the metabolic level, beyond the well-documented effects of high fatty acid levels on pyruvate oxidation and β -oxidation, our results demonstrate a 2.4-fold lowering of the contribution of anaplerotic pyruvate carboxylation to citrate synthesis. Despite the dual inhibitory effect of high fatty acids on pyruvate decarboxylation and carboxylation, tissue citrate levels were ~2-fold higher, but citrate release rates remained unchanged, probably limited by the activity of its mitochondrial or plasma membrane transporter. The latter results emphasize a differential modulation by fatty acids of anaplerotic pyruvate carboxylation and citrate release in the heart. Additional work is, however, needed to identify the mechanism by which fatty acids inhibit anaplerotic pyruvate carboxylation and to dissect out the various factors that confound the interpretation of measured cardiac citrate release rates. Of specific interest in this regard is the activity of cytosolic ATP-citrate lyase, for which our results suggest a differential modulation by LCFA versus MCFA and a potential impact on the cytosolic redox state and pH. The proposed lines of investigation appear relevant to the evaluation of the clinical role of anaplerotic interventions with pyruvate or of a MCFA diet in cardiac patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Blandine Comte and François Labarthe for their helpful comments. Thanks are also due to Ovid Da Silva of the Research Support Office, CHUM Research Centre, for his editorial assistance. Part of this work was presented at the XVII World Heart Congress of the International Society for Heart Research (ISHR) held in Winnipeg and at its satellite meeting held in Banff in July 2001. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Grants # 9575 and 10920 to C. Des Rosiers and a studentship to G.Vincent).

ABBREVIATIONS

α -KG: α -ketoglutarate
CAC: citric acid cycle
CE: cardiac efficiency
CP: cardiac power
CPT-I: carnitine palmitoyltransferase-I
CS: citrate synthase
GCMS: gas chromatography-mass spectrometry
HR: heart rate
LCFA: long-chain fatty acid
LDH: lactate dehydrogenase
LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure
LVP_{dev}: left ventricular developed pressure
LVP_{max}: maximum left ventricular pressure
MCFA: medium-chain fatty acid
MID: mass isotopomer distribution
MPE: molar percent enrichment
MVO₂: myocardial oxygen consumption
OAA: oxaloacetate
PDH: pyruvate dehydrogenase
RPP: rate pressure product

REFERENCES

1. **Awan MM and Saggerson ED.** Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295: 61-66, 1993.
2. **Bentham L, Keizer K, Wiegman CH, de Boer SF, Strubbe JH, Steffens AB, Kuipers F and Scheurink AJ.** Excess portal venous long-chain fatty acids induce syndrome X via HPA axis and sympathetic activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1286-E1293, 2000.
3. **Bermeyer HU.** *Methods of Enzymatic Analysis (2nd ed.)*. New York: Academic, vol. 3, section DII, Citric Acid Cycle Metabolites, p. 1562-1565 and 1585-1589, 1974.
4. **Boehm EA, Jones BE, Radda GK, Veech RL, and Clarke K.** Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H977-H983, 2001.
5. **Brunet J, Boily MJ, Cordeau S and Des Rosiers C.** Effects of N-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow. *Free Radic Biol Med* 19: 627-638, 1995.
6. **Burkhoff D, Weiss RG, Schulman SP, Kalil-Filho R, Wannenburg T and Gerstenblith G.** Influence of metabolic substrate on rat heart function and metabolism at different coronary flows. *Am J Physiol* 261: H741-H750, 1991.
7. **Chatham JC, Des Rosiers C and Forder JR.** Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E794-E802, 2001.
8. **Cheema-Dhadli S and Halperin ML.** Effect of palmitoyl-CoA and beta-oxidation of fatty acids on the kinetics of mitochondrial citrate transporter. *Can J Biochem* 54: 171-177, 1976.
9. **Cheema-Dhadli S, Robinson BH and Halperin ML.** Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can J Biochem* 54: 561-565, 1976.

10. **Comte B, Vincent G, Bouchard B and Des Rosiers C.** Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997.
11. **Comte B, Vincent G, Bouchard B, Benderdour M and Des Rosiers C.** Reverse flux through cardiac NADP(+)-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1505-H1514, 2002.
12. **Comte B, Vincent G, Bouchard B, Jette M, Cordeau S and Des Rosiers C.** A ^{13}C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997.
13. **Depre C, Rider MH and Hue L.** Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* 258: 277-290, 1998.
14. **Fahien LA, Davis JW and Laboy J.** Interactions between pyruvate carboxylase and other mitochondrial enzymes. *J Biol Chem* 268: 17935-17942, 1993.
15. **Farfari S, Schulz V, Corkey B, and Prentki M.** Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic β -cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49: 718-726, 2000.
16. **Gibala MJ, Young ME and Taegtmeyer H.** Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168: 657-665, 2000.
17. **Hajri T, Ibrahimi A, Coburn CT, Knapp FF Jr, Kurtz T, Pravenec M, and Abumrad NA.** Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* 276: 23661-23666, 2001.
18. **Korvald C, Elvenes OP and Myrnes T.** Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1345-H1351, 2000.

19. **Lancha AH, Jr., Recco MB and Curi R.** Pyruvate carboxylase activity in the heart and skeletal muscles of the rat. Evidence for a stimulating effect of exercise. *Biochem Mol Biol Int* 32: 483-489, 1994.
20. **Laplante A, Vincent G, Poirier M and Des Rosiers C.** Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A ^{13}C mass isotopomer study. *Am J Physiol* 272: E74-E82, 1997.
21. **Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM, Cohen LM and Nellis SH.** Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circ Res* 62: 535-542, 1988.
22. **Liu GX, Hanley PJ, Ray J and Daut J.** Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart. *Circ Res* 88: 918-924, 2001.
23. **Lloyd S, Brocks C, and Chatham JC.** Differential modulation of glucose, lactate, and pyruvate oxidation by insulin and dichloroacetate in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H163-H172, 2003.
24. **Longnus SL, Wambolt RB, Barr RL, Lopaschuk GD, and Allard MF.** Regulation of myocardial fatty acid oxidation by substrate supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1561-H1567, 2001.
25. **Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T and Schonekess BO.** Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1213: 263-276, 1994.
26. **Lopaschuk GD, Spafford MA, Davies NJ and Wall SR.** Glucose and palmitate oxidation in isolated working rat hearts reperfused after a period of transient global ischemia. *Circ Res* 66: 546-553, 1990.
27. **Lowenstein JM.** The tricarboxylic acid cycle. In: *Metabolic Pathways*, edited by Greenberg DM. New York: Academic, p. 147-269, 1967.
28. **Newsholme EA and Start C.** *Regulation in Metabolism*. New York: Wiley, 1976.
29. **Panchal AR, Comte B, Huang H, Dudar B, Roth B, Chandler M, Des Rosiers C, Brunengraber H and Stanley WC.** Acute hibernation decreases

myocardial pyruvate carboxylation and citrate release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1613-H1620, 2001.

30. **Panchal AR, Comte B, Huang H, Kerwin T, Darvish A, Des Rosiers C, Brunengraber H and Stanley WC.** Partitioning of pyruvate between oxidation and anaplerosis in swine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2390-H2398, 2000.
31. **Peuhkurinen KJ.** Regulation of the tricarboxylic acid cycle pool size in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 16: 487-495, 1984.
32. **Poirier M, Vincent G, Reszko AE, Bouchard B, Kelleher JK, Brunengraber H and Des Rosiers C.** Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1379-H1386, 2002.
33. **Randle PJ.** Fuel selection in animals. *Biochem Soc Trans* 14: 799-806, 1986.
34. **Rodgers RL, Christe ME, Tremblay GC, Babson JR and Daniels T.** Insulin-like effects of a physiologic concentration of carnitine on cardiac metabolism. *Mol Cell Biochem* 226: 97-105, 2001.
35. **Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D and Witters LA.** Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-E18, 1999.
36. **Russell RR III and Taegtmeyer H.** Pyruvate carboxylation prevents the decline in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *Am J Physiol* 261: H1756-H1762, 1991.
37. **Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, and Allard MF.** Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* 7: 161-173, 2002.
38. **Schulz H.** Regulation of fatty acid oxidation in heart. *J Nutr* 124: 165-171, 1994.
39. **Sluse FE, Meijer AJ and Tager JM.** Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett* 18: 149-153, 1971.
40. **Stanley WC and Chandler MP.** Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* 7: 115-130, 2002.
41. **Stanley WC, Hernandez LA, Spires D, Bringas J, Wallace S and McCormack JG.** Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl CoA levels in

- normal and ischemic swine myocardium: effects of dichloroacetate. *J Mol Cell Cardiol* 28: 905-914, 1996.
42. **Starnes JW, Wilson DF and Erecinska M.** Substrate dependence of metabolic state and coronary flow in perfused rat heart. *Am J Physiol* 249: H799-H806, 1985.
 43. **Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B and Baron AD.** Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* 100: 1230-1239, 1997.
 44. **Stojiljkovic MP, Zhang D, Lopes HF, Lee CG, Goodfriend TL and Egan BM.** Hemodynamic effects of lipids in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1674-R1679, 2001.
 45. **Sundqvist KE, Heikkila J, Hassinen IE and Hiltunen JK.** Role of NADP⁺ (corrected)-linked malic enzymes as regulators of the pool size of tricarboxylic acid-cycle intermediates in the perfused rat heart. *Biochem J* 243: 853-857, 1987.
 46. **Sundqvist KE, Hiltunen JK and Hassinen IE.** Pyruvate carboxylation in the rat heart. Role of biotin-dependent enzymes. *Biochem J* 257: 913-916, 1989.
 47. **Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP and Henningsen P.** Myocardial exchanges of glutamate, alanine and citrate in controls and patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 64: 33-40, 1983.
 48. **Thuesen L, Nielsen TT, Thomassen A, Bagger JP and Henningsen P.** Beneficial effect of a low-fat low-calorie diet on myocardial energy metabolism in patients with angina pectoris. *Lancet* 2: 59-62, 1984.
 49. **Vincent G, Comte B, Poirier M and Des Rosiers C.** Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846-E856, 2000.
 50. **Vincent G, Khairallah M, Bouchard B and Des Rosiers C.** Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ¹³C-substrates and ex vivo perfusion in the working mode. *Mol Cell Biochem* 242: 89-99, 2003.
 51. **Weiss JN and Venkatesh N.** Metabolic regulation of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovasc Drugs Ther* 7 Suppl 3: 499-505, 1993.

CHAPITRE VI : DISCUSSION

Ce projet de recherche avait pour but de vérifier l'hypothèse générale selon laquelle la cataplérose du citrate est un processus régulé, lequel joue un rôle dans la sélection des substrats pour la production d'énergie. Cette étude faisait suite aux questionnements soulevés par les travaux de Comte et ses collaborateurs (*Comte et al., 1997a et b*), lesquels avaient mis en évidence la présence de citrate dans l'effluent coronarien de cœurs perfusés. En fait, au début de la présente étude, il existait une controverse quant à l'existence de la cataplérose du citrate dans le cœur bien qu'il était déjà proposé dans la littérature que le citrate cytosolique puisse jouer un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique, via l'inhibition de la PFK. L'intérêt pour ce projet de recherche a été suscité par une série d'études, réalisées dans les années 80, rapportant une libération accrue de citrate dans le sinus coronarien de patients souffrants de maladies cardiaques. En outre, cette cataplérose augmentait de façon proportionnelle avec la sévérité de la maladie et était atténuée par une diète hypocalorique et hypolipidique (*Thomassen et al., 1983; Thuesen et al., 1984*).

Pour aborder la problématique, nous avons utilisé comme modèle d'étude le cœur de rat perfusé *ex vivo*. Une approche isotopique basée sur des substrats marqués au carbone 13 combiné à l'analyse des isotopomères de masse par CGSM a été utilisée afin de documenter la contribution des substrats à la synthèse du citrate et de mettre ces mesures en relation avec la cataplérose du citrate. Étant donné que la cataplérose du citrate représente une fuite de carbones catalytiques hors du CAC, une attention particulière a été portée à la contribution du pyruvate à la synthèse du citrate par carboxylation, une voie anaplérotique qui catalyse l'entrée de carbones catalytiques dans le CAC. La première section de cette discussion mettra l'accent sur des considérations méthodologiques. Elle traitera de façon critique de l'approche expérimentale choisie. Par la suite, les principaux résultats de cette thèse seront discutés et remis dans le contexte de la littérature actuelle.

VI.1 Considérations méthodologiques

VI.1.1 Le choix du modèle d'étude

Le modèle d'étude utilisé tout au long de la réalisation de ce projet de recherche est la perfusion de cœur isolé. Bien que ce modèle ne permette pas de dissocier la

contribution relative des différents types cellulaires (cardiomyocytes, fibroblastes, cellules endothéliales) ou régions du cœur au métabolisme cardiaque, son avantage est qu'il permet d'étudier conjointement le métabolisme énergétique et les paramètres fonctionnels (*Barr et al., 1997*). Tel que présenté en introduction (section I.9.1), il existe deux principales techniques de perfusion de cœur *ex vivo* : la perfusion Langendorff et la perfusion du « cœur au travail ». Ces deux techniques ont été utilisées pour la réalisation de ce projet.

Les analyses du processus de cataplérose du citrate de la première étude ont été réalisées à l'aide du système de perfusion Langendorff. Comparativement au modèle de base décrit dans la littérature, le montage de perfusion Langendorff utilisé avait été perfectionné afin de permettre la mesure des fonctions intra-ventriculaires. Précisément, suite à la chirurgie, un ballonnet de saline relié à un transducteur de pression était inséré dans la cavité du ventricule gauche pour toute la durée de l'expérience. Toutefois, suite à l'obtention des résultats de notre première étude démontrant une régulation de la cataplérose du citrate par l'apport en substrats et par la demande énergétique, il s'avérait essentiel de poursuivre la caractérisation du phénomène dans des cœurs perfusés « au travail ». En effet, la charge de travail imposée au muscle cardiaque détermine en grande partie la demande énergétique exigée, laquelle influence directement la synthèse du citrate et par conséquent, l'activité du CAC. Ainsi, la méthode de perfusion du « cœur au travail » est plus physiologique que la méthode Langendorff puisque la charge de travail imposée au cœur reproduit celle qui prévaut *in situ*. Aussi, afin d'évaluer la signification physiologique des résultats obtenus lors de la première étude, les cœurs ont été perfusés avec un mélange de substrats imitant la composition du sang et incluant des glucides (glucose, lactate et pyruvate), et des acides gras à chaîne longue (oléate).

Une étape importante de ce projet a été la mise au point du système de perfusion de « cœur au travail ». Cette technique de perfusion a été instaurée suite à un séjour d'apprentissage dans le laboratoire de « Nutritional Biochemistry » dirigé par le Dr Brunengraber, à Case Western Reserve University, aux États-Unis. Spécifiquement, suite à la publication du premier manuscrit, une année de travail a été dédiée à la mise au point et à l'adaptation de cette technique pour l'investigation métabolique en

présence de substrats marqués au carbone 13 et l'analyse d'isotopomères de masse par CGSM. En outre, plusieurs améliorations ont été apportées au système de perfusion de « cœur au travail » décrit dans la littérature, lequel est utilisé avec des substrats radioactifs (*Lopaschuk et al., 1997*), soit : (i) la mesure simultanée des débits cardiaque et aortique, (ii) la mesure constante de la pré-charge imposée au cœur, ainsi que (iii) la mesure des fonctions contractiles intra-ventriculaires à l'aide d'une canule insérée à l'apex du ventricule gauche. De plus, le système a été adapté afin de permettre une semi-recirculation du tampon de perfusion - par opposition à un système recirculant - afin d'éviter le recyclage des métabolites, marqués ou non marqués, libérés par le cœur. En effet, bien que l'utilisation d'un système avec un perfusat recirculant diminue les coûts d'expérimentation, il en résulte une modification graduelle du tampon de perfusion au cours de l'expérience qui peut compromettre sérieusement l'interprétation des résultats (*Evans et al., 2000*).

Par ailleurs, bien que l'organe isolé ne soit pas innervé, donc exempt de stimuli neurohormonaux, et ne soit pas soumis à l'action des hormones circulantes (*Ferrari et al., 1999; Evans et al., 2000*), la validité de ce modèle pour l'investigation métabolique est soulignée par le fait que les résultats obtenus sont en accord avec ceux provenant du modèle de perfusion de cœur de cochon *in situ*. En effet, l'équipe du Dr Stanley a transposé la méthodologie des mesures de flux avec les substrats marqués au carbone 13 au modèle de perfusion *in situ* (*Panchal et al., 2000*; voir section VI.2.2 et Figure 3). La perfusion du cœur *in situ* offre l'avantage d'étudier l'organe dans son propre environnement (*Ferrari et al., 1999; Evans et al., 2000*), où il est soumis aux fluctuations hormonales et à la stimulation des nerfs sympathiques et parasympathiques. Par contre, les coûts impliqués dans de telles études s'avèrent une limitation importante.

En résumé, le cœur perfusé *ex vivo* s'est avéré un choix judicieux pour la réalisation de cette étude puisqu'il offrait l'avantage de la flexibilité pour la caractérisation du processus de cataplérose du citrate tout en permettant le phénotypage métabolique et fonctionnel du cœur et l'obtention de résultats qui s'apparentent à ceux obtenus *in situ*.

VI.1.1.1 Le choix des substrats exogènes et de la stratégie de marquage

Le choix des substrats exogènes avec lesquels les cœurs ont été perfusés a varié en fonction des objectifs de chacune des études. L'objectif de la première étude était, entre autres, de déterminer si la cataplérose du citrate pouvait être modulée par l'apport en substrats énergétiques exogènes. Spécifiquement, il s'agissait de démontrer l'importance relative des substrats exogènes fournissant l'acétyl-CoA et l'OAA, à la synthèse du citrate. Ainsi, pour cette étude, la concentration et le type de substrat ajouté dans le tampon de perfusion ont été modifiées radicalement. De plus, il s'est avéré avantageux d'utiliser un acide gras à chaîne moyenne, l'octanoate, bien qu'il ne soit pas un substrat physiologique. De fait, contrairement aux acides gras à chaîne longue, l'octanoate est hydrosoluble et traverse la membrane mitochondriale sans subir de contrôle au niveau de la CPT-I. Ainsi, comme la β -oxydation de l'octanoate n'est pas régulée par la CPT-I, la production d'acétyl-CoA a pu être manipulée en variant la concentration exogène de cet acide gras à chaîne moyenne.

Pour la seconde et la troisième étude, l'emphase a été mise sur l'ajout d'un mélange de substrats et d'hormones reproduisant le plus possible la composition du sang, car un des objectifs était d'évaluer la signification physiologique des résultats de la première étude. Pour cette raison, le tampon Krebs-Henseleit a été supplémenté avec des concentrations physiologiques de glucose, d'insuline, de lactate, de pyruvate, de carnitine et d'oléate, un acide gras à chaîne longue. Le lactate et le pyruvate ont été ajoutés dans un rapport de 5 pour 1, afin de maintenir l'état redox de la cellule. L'ajout de carnitine en concentration physiologique permet de compenser la perte découlant de l'isolement de l'organe (*Rodgers et al., 2001*). L'oléate a été complexé à des concentrations physiologiques d'albumine. L'effet d'une augmentation de la concentration d'oléate de 0,4 mM à 1 mM, correspondant à celle retrouvée respectivement dans des conditions post-prandiale et de jeûne, a été documenté. Finalement, l'effet d'augmenter la concentration exogène en acides gras de 0,4 mM à 1 mM avec de l'octanoate, au lieu de l'oléate, a également été documenté afin d'évaluer la conséquence, sur la cataplérose du citrate, d'une hausse de l'apport en acétyl-CoA issu d'une β -oxydation non régulée par la CPT-I.

La stratégie de marquage isotopique utilisée pour l'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse est basée sur celle développée et décrite dans la publication de

Comte et ses collaborateurs (Comte et al., 1997a et b). Spécifiquement, pour l'étude de la contribution relative des substrats énergétiques aux différentes voies métaboliques impliquées dans la synthèse du citrate, un mélange de trois traceurs a été utilisé comprenant le [U-¹³C₃]pyruvate, le [U-¹³C₃]lactate et un acide gras, soit le [1-¹³C] ou [1,2-¹³C₂]octanoate, ou le [1-¹³C] ou [U-¹³C₁₈]oléate. Afin de différencier les voies de formation du citrate, les traceurs sélectionnés doivent être métabolisés en différents isotopomères de masse du citrate. En bref, le métabolisme du [U-¹³C₃]pyruvate et [U-¹³C₃]lactate entraîne la formation d'acétyl-CoA uniformément marqué (M+2) via la voie de décarboxylation du pyruvate, et d'OAA M+3 via la voie de carboxylation du pyruvate. L'oxydation du [1-¹³C]octanoate ou du [1-¹³C]oléate entraîne la formation d'acétyl-CoA marqué sur un seul carbone (M+1). La combinaison de l'acétyl-CoA avec l'OAA forme ensuite divers isotopomères de citrate. Tel que représenté à la figure suivante, il est possible, suite au clivage de la molécule de citrate, de déterminer les contributions relatives des divers substrats à la synthèse du citrate (Figure 1). Le citrate est clivé par la citrate lyase en sa portion acétyl (AC^{CIT}) et sa portion OAA (OAA^{CIT}). Le marquage du citrate et de l'OAA^{CIT} est déterminé par CGSM, ce qui permet ensuite l'extrapolation du marquage de la portion AC^{CIT}. Le traitement mathématique des données permet d'évaluer la contribution relative (i) de la décarboxylation du pyruvate, (ii) de la carboxylation du pyruvate, (iii) de l'oxydation des acides gras, et (iv) des autres sources endogènes, à la synthèse de citrate.

Il convient de souligner que des modifications ainsi que des ajouts ont été apportés à la méthodologie décrite par Comte et ses collaborateurs (Comte et al., 1997b). D'une part, lorsque des cœurs ont été perfusés en présence de [1-¹³C]oléate, [U-¹³C₃]lactate et [U-¹³C₃]pyruvate, c'est-à-dire dans des conditions où la décarboxylation du pyruvate est substantielle (> 40%), il s'est avéré que l'utilisation des équations 18 et 19 décrites dans le manuscrit (Comte et al., 1997b) ne permettait pas de déterminer avec précision la contribution relative du pyruvate et des acides gras à la formation de l'acétyl-CoA du citrate. Bien que la solution à ce problème serait de déterminer l'enrichissement de la portion acétyl du citrate directement, plutôt que par extrapolation à partir des enrichissements mesurés du citrate et de sa portion OAA, la mise au point d'une telle méthode s'est avérée problématique et n'est toujours pas complétée. Une solution alternative a donc dû

être envisagée et cette dernière est décrite dans le deuxième et le troisième manuscrit. En fait, les cœurs ont été perfusés en présence d'un seul traceur à la fois. Bien que cette stratégie double le nombre de perfusions nécessaires pour obtenir la même quantité d'informations métaboliques, elle permet l'obtention de résultats plus précis.

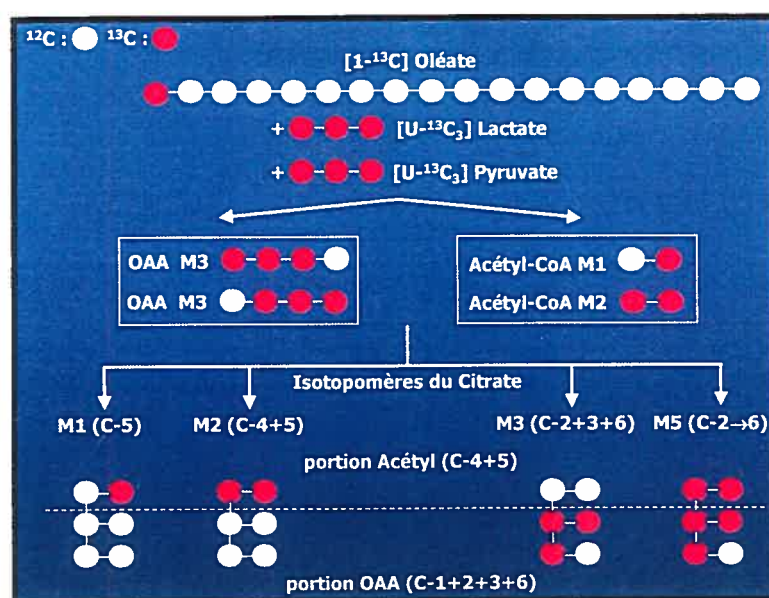


Figure 1. Représentation schématique de quelques exemples d'isotopomères du citrate obtenus suite au métabolisme des traceurs $[1-^{13}\text{C}]$ oléate, $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ lactate et $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ pyruvate

D'autre part, le protocole d'analyse a été modifié afin d'obtenir une autre mesure indirecte de l'activité de la glycolyse, puisque dans l'étude de Comte et ses collaborateurs, le flux glycolytique avait seulement été évalué à partir de l'enrichissement du pyruvate tissulaire (Flux glycolytique = $1 - (\text{MPE pyruvate M}+3)$) (Comte *et al.*, 1997a). C'est précisément suite aux évidences de la littérature qui suggéraient une compartimentation du métabolisme du lactate (Chatham *et al.*, 2001), qu'il s'est avéré essentiel d'inclure des mesures additionnelles. Ainsi, le deuxième et le troisième manuscrit rapportent également des mesures de la vitesse de captation de lactate et de pyruvate exogènes (^{13}C lactate et ^{13}C pyruvate) par le cœur perfusé, de même que des mesures de la vitesse de libération de lactate et de pyruvate endogènes (^{12}C lactate et ^{12}C pyruvate) dans l'effluent coronarien. Tel

que présenté à la Figure 2, le lactate non marqué détecté dans le perfusat effluent provient du métabolisme du glucose exogène ou du glycogène endogène.

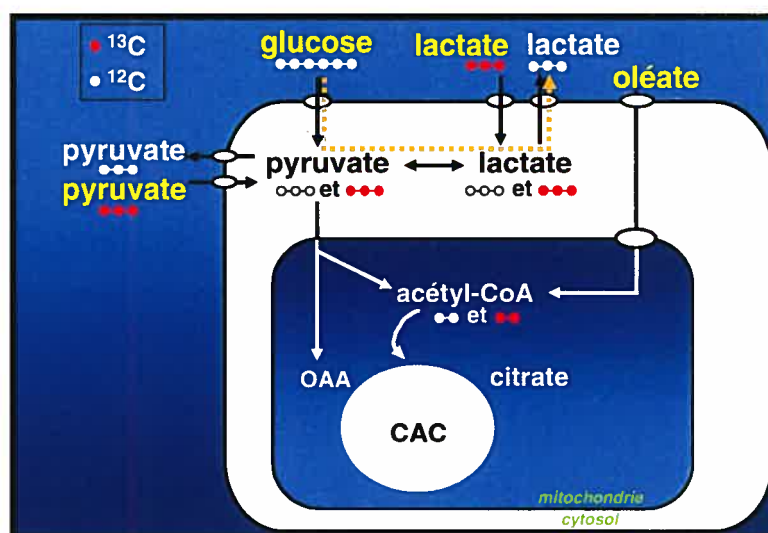


Figure 2. Représentation schématique de la provenance du $[^{12}\text{C}]$ lactate mesuré dans l'effluent coronarien des cœurs perfusés

Bien que dans l'ensemble la stratégie de marquage isotopique utilisée s'est avérée adéquate, en permettant de mettre en relation les données sur la contribution relative des substrats à la synthèse du citrate, incluant l'anaplérose, avec les données sur la cataplérose du citrate, elle n'a pas permis d'adresser directement le rôle du citrate en tant que molécule signal régulant l'activité de la glycolyse. À cet égard, il est possible que des informations plus précises auraient pu être obtenues en perfusant les cœurs avec le $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ glucose.

Par ailleurs, en ce qui a trait à la mesure de libération de citrate dans l'effluent coronarien il n'est pas exclu que le métabolisme cardiaque soit oscillatoire et que les niveaux de citrate cytosolique et de libérations du citrate subissent des variations temporelles sans que des changements ne soient détectés ou mesurables avec la technologie de notre système d'étude.

VI.1.2 Le choix du modèle animal de pathologie cardiaque

Suite aux résultats obtenus chez l'animal sain dans le premier manuscrit, il apparaissait pertinent de caractériser le processus de cataplérose du citrate dans un

cœur de rat souffrant d'une pathologie cardiaque s'apparentant à une pathologie humaine. Le rat spontanément hypertendu SHR a été sélectionné. Ce modèle de provient de croisements de rats Wistar ayant une pression artérielle élevée. C'est entre la 9^e et la 12^e semaine d'âge que les signes d'hypertrophie apparaissent, alors que l'hypertension est détectée plus tôt, soit vers la 6^e semaine. Le cœur d'un rat SHR âgé de 15 semaines est considéré comme étant dans une phase d'hypertrophie compensatoire. Durant cette période les cardiomyocytes s'hypertrophient et on dénote une augmentation de la population de fibroblastes, de même qu'une augmentation de la synthèse d'ADN (*Lui et al., 2000; Hu et al., 2002*). La période d'hypertrophie dite de compensation est suivie d'une phase transitoire de décompensation menant à la défaillance cardiaque. Cette progression lente de la maladie avec l'âge fait du rat SHR un modèle fort utile pour l'étude du métabolisme cardiaque à différents stades de la pathologie.

Ainsi, lors de la deuxième étude, les cœurs de rats SHR âgés de 15 semaines ont été isolés et perfusés en présence de glucose, insuline, lactate, pyruvate et oléate à des concentrations physiologiques. La concentration d'oléate a été fixée à 0,4 mM, soit celle retrouvée en état de post-absorption. Bien que le choix de ce modèle comporte certains avantages, il convient néanmoins de reconnaître ses limites ainsi que les limites de l'étude telles que décrites dans le deuxième manuscrit. Premièrement, le rat SHR est un modèle génétique d'hypertension qui présente une grande variabilité inter-individuelle. Étant donné que la maladie progresse lentement avec l'âge, il aurait été utile de documenter un ou des marqueurs spécifiques de l'évolution de la maladie, tels les niveaux d'expression du gène de l'ANP (« atrial natriuretic peptide »). L'ANP est une hormone cardiaque produite majoritairement au niveau des oreillettes. Sa présence dans le tissu cardiaque et le sang est considérée comme un des principaux marqueurs d'hypertrophie myocardique (*Jankowski et al., 2001*).

Deuxièmement, en ce qui concerne le témoin du rat SHR, la plupart des chercheurs optent pour les descendants normotendus des rats Wistar provenant de la colonie de Kyoto à partir de laquelle la lignée de rats SHR a été obtenue. Toutefois, il est à noter que certaines publications rapportent que ces rats normotendus, portant l'appellation WKY (Wistar-Kyoto), avaient été distribués avant l'obtention d'une

souche pure (vingt générations et plus de croisements frère-sœur) (*Kurtz et al., 1987; H'Doubler et al., 1991*). Selon ces auteurs, les rats WKY présentent une variabilité biologique plus importante que celle des rats SHR. D'ailleurs, dans la présente étude certains cœurs de rats WKY ont été exclus vu leur aspect atypique.

Troisièmement, il conviendrait de vérifier ultérieurement si les résultats obtenus chez le rat SHR peuvent être reproduits dans un modèle d'hypertrophie cardiaque obtenue par constriction aortique. Cette technique requiert, suite à une incision latérale de la paroi abdominale, la mise en place d'une hémoclipe autour de l'aorte abdominale au niveau supra rénal de telle sorte que lors de la croissance normale de l'animal le degré de constriction de l'aorte abdominale augmente graduellement (*Allard et al., 1994*). Ainsi, ce modèle d'étude obtenu suite à une intervention chirurgicale est plus spécifique que le modèle génétique.

Finalement, lors de cette étude les cœurs ont été perfusés à une pression de travail de 80 mmHg. Cette pression correspond à celle imposée à un cœur de rat normal, mais s'avère inférieure à celle retrouvée chez le rat SHR, soit entre 95 et 120 mmHg. Ainsi, il serait pertinent que des études ultérieures documentent l'effet de la charge de travail sur le métabolisme énergétique des cœurs de rats SHR.

VI.2 Considérations physiologiques

C'est au cours de cette deuxième section que les principaux résultats de cette thèse seront présentés et discutés dans le contexte de la littérature actuelle. Les mesures de contributions relatives des substrats à la synthèse du citrate seront mises en relation avec celles sur la cataplérose citrate. Étant donné que ce processus représente une fuite de carbones catalytiques hors du CAC, une attention particulière a été portée à la contribution du pyruvate à la synthèse du citrate par carboxylation, soit une voie anaplérotique qui catalyse l'entrée de carbones catalytiques dans le CAC.

VI.2.1 La cataplérose du citrate et sa régulation

On définit la cataplérose du citrate comme la sortie de carbones catalytiques du CAC, de la mitochondrie vers le cytosol. Des réactions cataplérotiques sont retrouvées au niveau de plusieurs autres tissus tels que le foie, les reins, le petit

intestin, le tissu adipeux, le muscle squelettique et le pancréas endocrine (*Owen et al., 2002; Farfari et al., 2000*). Dans le foie et le tissu adipeux, il est reconnu depuis longtemps que la cataplérose du citrate permet le transfert des molécules d'acétyl-CoA de la mitochondrie au cytosol où elles sont nécessaires à la synthèse *de novo* des acides gras. Dans le muscle squelettique (*Ruderman et al., 1999; Saha et al., 1997; Saha et al., 1999*) et les cellules- β (*Prentki et al., 1996*), le citrate cytosolique aurait plutôt un rôle de signal d'abondance en substrats énergétiques. Dans le cœur, jusqu'à tout récemment, le rôle du citrate était confiné principalement à sa participation au CAC dans la mitochondrie. La cataplérose du citrate mitochondrial dans le cœur était un sujet de vives controverses basées surtout sur la faible activité du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques, du moins comparativement à celle retrouvée dans les tissus lipogéniques. Bien que dans les années 70 des expériences réalisées sur des mitochondries isolées de cœur aient mis en évidence un efflux mitochondrial de citrate (*Robinson et al., 1975; Cheema-Dhadli et al., 1976*), aucune expérimentation n'avait été réalisée auparavant sur le cœur intact.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de caractériser ce processus dans le cœur de rat perfusé *ex vivo*. Le processus de cataplérose du citrate mitochondrial a été étudié en se basant sur la quantité et le marquage du citrate libéré dans l'effluent coronarien. Il convient de souligner que l'ampleur du processus est probablement sous-estimée dans la mesure où (i) une fraction du citrate cytosolique pourrait être métabolisée par l'ATP citrate lyase (ACL), et (ii) il existe un système de transport régulé de la molécule de citrate au niveau de la membrane plasmatique.

VI.2.1.1 La spécificité du processus de libération du citrate

Étant donné les controverses reliées à la présence de citrate hors de la mitochondrie, il s'avérait crucial de démontrer que la libération du citrate par le cœur est un processus spécifique qui reflète sa cataplérose mitochondriale. Plusieurs évidences expérimentales présentées dans le premier manuscrit supportent ce point. Premièrement, le patron de marquage du citrate libéré par les cœurs perfusés avec des substrats marqués au carbone 13 reflète celui du citrate tissulaire. De fait, il existe une corrélation significative entre l'enrichissement des isotopomères de

masse du citrate tissulaire et du citrate effluent quel que soit le mélange de substrats marqués au carbone 13.

Deuxièmement, il était nécessaire de s'assurer que la présence du citrate dans l'effluent coronarien n'était pas la conséquence d'une nécrose cellulaire. Ainsi, conjointement aux mesures de libération du citrate, le taux de libération de la LDH, un marqueur de l'intégrité membranaire, a été quantifié de même que celui du succinate, un autre intermédiaire du cycle de Krebs, dont l'efflux augmente en condition ischémique (*Laplante et al. 1997*). Les résultats démontrent clairement l'absence de corrélation entre le taux de libération du citrate et celui de la LDH et du succinate.

Enfin, la participation du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques a été évaluée à l'aide du 1,2,3-BTC, le seul inhibiteur spécifique connu de ce transporteur. L'ajout de 1,2,3-BTC a entraîné une baisse significative de l'efflux de citrate, contrairement à son analogue inactif, le 1,2,4-BTC. Le fait que l'inhibition n'ait été que partielle, soit de 25%, comparativement à celle observée dans les mitochondries isolées (~80%) (*Robinson et al., 1975*), pourrait être attribuable à une faible perméabilité de la membrane plasmique et/ou un encombrement stérique ne permettant pas à une quantité suffisante d'inhibiteur de rejoindre le transporteur dans la membrane mitochondriale. En outre, l'existence d'un autre mécanisme de transport du citrate ne peut être entièrement exclue. Selon l'équipe de Kauppinen, le citrate pourrait être converti en α -cétoglutarate selon la réaction normale du CAC, après quoi l' α -cétoglutarate formé serait transporté dans le cytosol via le transporteur des acides dicarboxyliques. C'est ensuite la réaction inverse de la NADP⁺-ICDH cytosolique qui permettrait de régénérer le citrate dans le cytosol (*Kauppinen et al., 1982*). Bien que l'activité du transporteur mitochondrial des acides dicarboxyliques soit supérieure à celle des acides tricarboxyliques (*Huizing et al., 1998*), selon Plaut et ses collaborateurs l'activité de la NADP⁺-ICDH cytosolique représente tout au plus 2% de l'activité totale de la NADP⁺-ICDH du myocarde (*Plaut et al., 1983*). Par ailleurs, les travaux de Comte et ses collaborateurs, réalisés sur des cœurs de rats perfusés en présence de [U-¹³C₅]glutamate, ont évalué à 5% la contribution de la voie inverse de la NADP⁺-ICDH mitochondriale à la formation de citrate (*Comte et al., 1997; Comte et al., 2002*). Ceci fait en sorte que la contribution

maximale de cette voie alternative à la formation du citrate cytosolique serait estimée à au plus 20%.

VI.2.1.2 La cataplérose du citrate est modulée par la disponibilité des substrats exogènes et la demande énergétique

En plus de démontrer que la cataplérose du citrate est un processus spécifique, la première étude a permis de mettre en évidence une modulation de ce processus par l'apport en substrats exogènes, de même que par la demande énergétique. Pour ce, des cœurs ont été perfusés en présence de divers mélanges de substrats énergétiques dans le but spécifique de modifier l'apport en OAA et en acétyl-CoA pour la formation de citrate par la citrate synthase. Spécifiquement, les cœurs ont tous été perfusés avec des concentrations physiologiques de glucose, alors que les concentrations des substrats suivants ont été variées : le lactate et le pyruvate pour l'apport en OAA, et l'octanoate pour l'apport en acétyl-CoA. Tel que discuté précédemment, l'octanoate a été choisi parce que contrairement aux acides gras à chaîne longue, il est hydrosoluble et sa β -oxydation n'est pas régulée par la CPT-I. L'ajout d'octanoate marqué au carbone 13 a permis de documenter sa contribution à la portion acétyl (AC^{CIT}) du citrate.

Les résultats obtenus dans la première étude montrent que la libération de citrate dans l'effluent varie en fonction de l'apport en substrats énergétiques. Un taux maximal de libération de citrate, c'est-à-dire 21 nmol/min, a été observé lorsque les cœurs étaient perfusés en présence de glucose 11 mM, lactate 1 mM, pyruvate 0,2 mM et octanoate 0,2 mM. Ce mélange de substrats exogènes fournirait un apport non-limitant en acétyl-CoA et en OAA pour la synthèse de citrate. En fait, dans cette condition métabolique, le taux de formation d'acétyl-CoA, lequel provient principalement de la β -oxydation de l'octanoate, excède celui de son utilisation pour la synthèse de citrate. Ceci est d'ailleurs reflété par une importante libération de corps cétoniques, de l'ordre de 275 nmol/min. Cette production de corps cétoniques par le cœur, principalement du β -hydroxybutyrate, s'effectue à partir de deux unités acétyl-CoA par le renversement des réactions catalysées par l'acétoacétyl-CoA thiolase et la thioacyltransférase, un processus appelé pseudocétogénèse. Quant à la formation d'OAA, les analyses isotopiques réalisées précédemment par Comte et ses collaborateurs (*Comte et al., 1997a et b*) révèlent que dans cette condition, la

carboxylation du pyruvate est favorisée par rapport à sa décarboxylation qui est fortement inhibée. Une augmentation des rapports acétyl-CoA/CoA et NADH/NAD⁺ en provenance de la β -oxydation pourrait être à l'origine de cette inhibition de la PDH.

L'importance spécifique de l'apport en acétyl-CoA et en OAA pour la synthèse du citrate a été renforcée par les résultats des analyses où soit : (i) la concentration d'octanoate exogène a été diminuée de 0,2 à 0,02 mM, (ii) les cœurs ont été perfusés en absence de lactate et de pyruvate, (iii) le glucose a été le seul substrat ajouté au tampon de perfusion. Dans tous les cas, ces modifications de la composition du tampon ont résulté en une baisse de la libération du citrate dans l'effluent coronarien variant de 15 à 90%, le plus faible taux de cataplérose ayant été observé lorsque les cœurs ont été perfusés en présence de glucose seulement.

En parallèle, l'impact d'une augmentation de la demande énergétique induite par une stimulation adrénergique sur le taux de libération du citrate a également été investigué. Selon les résultats obtenus, la présence d'un agoniste β -adrénergique, c'est-à-dire l'isoprotérénol, réduit significativement la libération de citrate par les cœurs perfusés en présence de tous les substrats. Ce résultat est en accord avec le concept qu'une augmentation de la demande énergétique imposée au cœur devrait accroître l'utilisation du citrate par le CAC.

En résumé, les résultats décrits ci-dessus ont permis de quantifier et caractériser le processus de libération de citrate par le cœur isolé. Ce processus est de l'ordre de 5 à 21 nmol/min, ce qui représente moins de 2% de la vitesse du CAC. De plus, la cataplérose du citrate est spécifique et modulée par la disponibilité et l'abondance des substrats énergétiques exogènes et par la demande énergétique. Ceci est en accord avec le rôle crucial du citrate dans la mitochondrie et son rôle proposé de molécule signal régulant l'utilisation des glucides et des acides gras dans le cytosol.

VI.2.2 La cataplérose du citrate en conditions physiologiques

Il convient de souligner que tous les résultats décrits à la section précédente ont été obtenus dans des cœurs perfusés *ex vivo* dans le mode Langendorff en présence d'un acide gras à chaîne moyenne, l'octanoate. Il s'avérait donc pertinent de

déterminer la signification physiologique de ces résultats en poursuivant cette étude dans des cœurs perfusés en présence d'un acide gras à chaîne longue. Ainsi, des expériences ont été réalisées, dans un premier temps, avec le système de perfusion Langendorff, et dans un deuxième temps, avec un système de perfusion du « cœur au travail ». Ainsi, la présente section discute des résultats obtenus dans des cœurs qui ont été perfusés en présence de substrats imitant la composition de sang, incluant de l'oléate. En outre, comme la cataplérose du citrate devrait être compensé par l'anaplérose, les taux de libération du citrate seront mis en rapport avec la carboxylation du pyruvate. La cataplérose du citrate sera également mis en rapport avec (i) les contributions relatives des substrats énergétiques à la formation d'acétyl-CoA pour la synthèse du citrate, (ii) la concentration tissulaire du citrate, et (iii) les vitesses du CAC estimées à partir des consommations d'oxygène.

Les résultats obtenus dans le premier groupe d'expériences réalisées sur des cœurs perfusés en présence d'oléate selon le mode Langendorff sont rapportés dans la première publication et résumés à la Figure 3. Ceux-ci mettent en évidence la contribution préférentielle de la β -oxydation des acides gras à la formation d'acétyl-CoA sous cette condition métabolique. La contribution de la décarboxylation du pyruvate à la réaction de la citrate synthase représente $11 \pm 3\%$, et la contribution de la carboxylation du pyruvate à la réaction de la citrate synthase, c'est-à-dire l'anaplérose, est de $2,4 \pm 0,2\%$. En outre, la vitesse du CAC est estimée à environ $2,0 \pm 0,3 \mu\text{mol}/\text{min}$ (Comte et al., 1997a). En ce qui a trait à la cataplérose du citrate, le taux de libération du citrate dans l'effluent coronarien (flèche en trait pointillé) a été évalué à $18 \pm 1 \text{ nmol}/\text{min}$. En fait, il apparaît que la cataplérose du citrate (i) représente moins de 1% de la vitesse du CAC, ce qui est en accord avec le rôle énergétique mitochondrial du citrate, (ii) est en accord avec la faible activité du transporteur mitochondrial du citrate, et (iii) est balancée par l'entrée de carbones catalytiques au niveau du pyruvate laquelle est au moins 2 fois supérieure. La Figure 3 présente également des résultats qui ont été obtenus sur des cœurs de rats perfusés « au travail » avec un mélange de substrats physiologiques. La contribution des divers substrats à la formation du citrate ainsi que la libération du citrate mesurée dans les cœurs perfusés au travail sont similaires à celles observées dans les cœurs perfusés selon le mode Langendorff, bien que la vitesse du CAC soit augmentée, ce qui est en accord avec la plus grande demande en

énergie imposée par la charge de travail. Finalement, tel que démontré également à la Figure 3, les résultats sont en accord avec ceux rapportés par Panchal et ses collaborateurs dans les cœurs de cochon perfusés *in situ* (Panchal et al., 2000). Cette analyse comparative permet de conclure que les résultats des études métaboliques réalisées dans le cœur perfusé *ex vivo* reflètent ceux obtenus dans le cœur perfusé *in situ*.

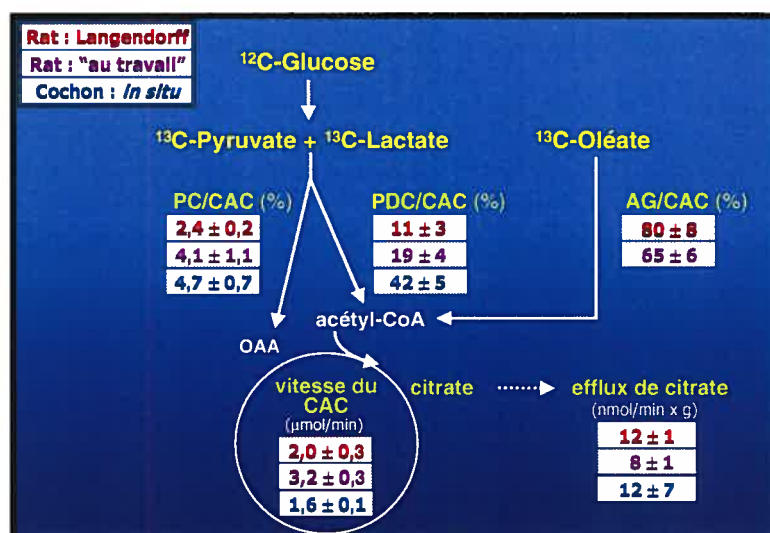


Figure 3. Phénotypage métabolique des cœurs perfusés *ex vivo* et *in situ* : comparaison de la dynamique cardiaque en lien avec la cataplérose du citrate dans divers modèles d'études

Perfusions *ex vivo* de cœurs Langendorff : les cœurs de rat ont été perfusés 60 minutes en présence de 5,5 mM glucose, 8 nm insuline, 1 mM [U- ^{13}C]lactate, 0,2 mM [U- ^{13}C]pyruvate, 0,4 mM [1- ^{13}C]oléate-4% albumine et 50 μM carnitine.

Perfusions *ex vivo* de « cœurs au travail » : les cœurs de rat Wistar ont été perfusés 30 minutes en présence de 5,5 mM glucose, 8 nm insuline, 1 mM [U- ^{13}C]lactate, 0,2 mM [U- ^{13}C]pyruvate, 0,4 mM [1- ^{13}C]oléate-3% albumine et 50 μM carnitine.

Perfusions *in situ* de cœurs de cochon (Panchal et al., 2000) : les cœurs de cochon ont été infusés *in situ* pendant 60 minutes avec 1 mM [U- ^{13}C]lactate, 0,1 mM [U- ^{13}C]pyruvate et de l'Intralipide (résultant en une concentration finale d'acides gras libres de 0,6 mM).

PC/CAC; contribution de la carboxylation du pyruvate au CAC, PDC/CAC; contribution de la décarboxylation du pyruvate au CAC, AG/CAC; contribution des acides gras au CAC.

VI.2.2.1 Effet d'une augmentation de la concentration en acides gras

Étant donné que la première étude avait mis en évidence une modulation de la libération de citrate par l'apport en substrats exogènes, une autre étude a été réalisée dans le cœur de rat perfusé « au travail » afin d'évaluer l'effet d'une augmentation de la concentration exogène d'acide gras de 0,4 à 1 mM. Les effets

de cette augmentation de 0,6 mM en acides gras ont été évalués avec l'oléate de même qu'avec l'octanoate. Les résultats de cette étude font l'objet du troisième manuscrit. La Figure 4 résume les données relatives aux contributions des acides gras et du pyruvate à la synthèse de citrate, et les vitesses du CAC et de libération du citrate, alors que la Figure 5 rapporte l'effet de l'apport en acides gras sur la contribution relative des divers substrats à la synthèse d'ATP. L'augmentation de la concentration en acides gras exogènes a eu les effets attendus sur la sélection des substrats pour la production d'acétyl-CoA : la contribution des acides gras augmente alors que celle de la décarboxylation du pyruvate est considérablement réduite. Ces changements se reflètent aussi sur la contribution relative des substrats énergétiques à la synthèse d'ATP. De fait, la contribution de l'oxydation des lipides augmente de ~36% à ~80%, celle de l'oxydation des glucides diminue de ~60% à ~15%, alors que la contribution de la glycolyse demeure inchangée, soit à ~4%.

Par ailleurs, la hausse de l'apport en acides gras a résulté en une diminution de plus de 50% de la carboxylation du pyruvate anaplérotique. L'efflux de citrate cataplérotique est demeuré inchangé, et ce, même si l'octanoate est ajouté plutôt que l'oléate, représentant < 17% de la carboxylation du pyruvate. Ces données suggèrent que dans la condition physiologique de 0,4 mM oléate, la sortie de citrate de la mitochondrie au cytosol se trouve déjà à son niveau maximal, bien qu'elle reste largement compensée par l'anaplérose.

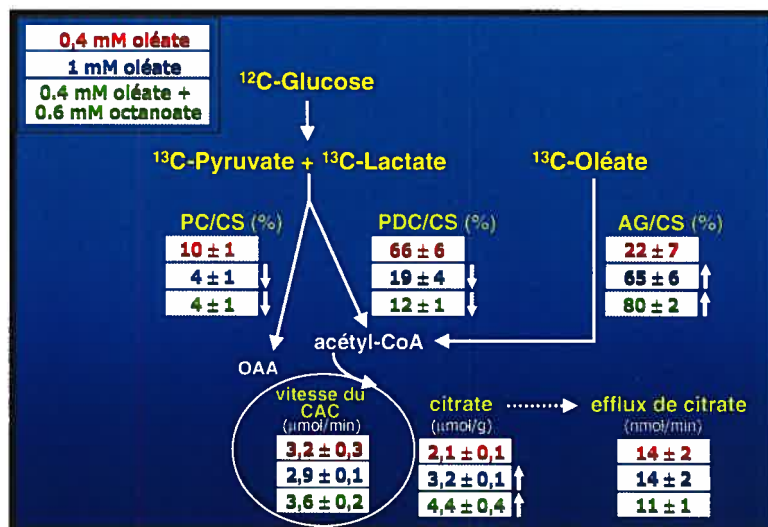


Figure 4. Phénotypage métabolique du cœur perfusé *ex vivo* selon le modèle du « cœur au travail » : effets des acides gras

Les cœurs de rat Wistar ont été perfusés en présence de 5,5 mM glucose, 8 nm insuline, 1 mM [U-¹³C]lactate, 0,2 mM [U-¹³C]pyruvate, 50 μM carnitine, 0,4 mM [1-¹³C]oléate-3% albumine, ou 1 mM [1-¹³C]oléate-3% albumine, ou 0,4 mM oléate-3% albumine + 0,6 mM [1-¹³C]octanoate. PC/CS; contribution de la carboxylation du pyruvate à la réaction de la citrate synthase, PDC/CS; contribution de la décarboxylation du pyruvate à la réaction de la citrate synthase, AG/CS; contribution des acides gras à la réaction de la citrate synthase. ↑; hausse significative $P < 0,05$, ↓; baisse significative $P < 0,05$.

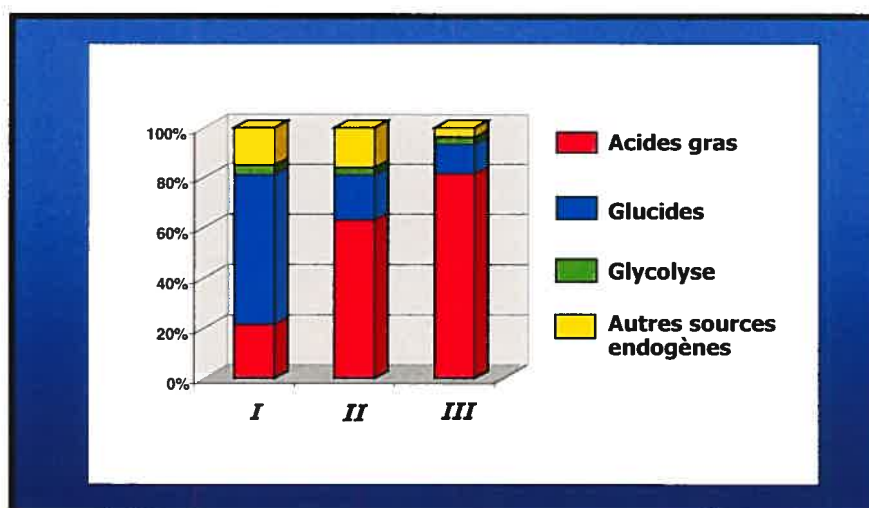


Figure 5. Contribution relative (%) des substrats énergétiques à la production d'ATP dans le cœur sain perfusé « au travail » en présence de diverses concentrations d'acides gras

Les cœurs de rat Wistar sont perfusés en présence de 5,5 mM glucose, 8 nm insuline, 50 μM carnitine, 1 mM lactate, 0,2 mM pyruvate, 0,4 mM oléate (Groupe I), 1 mM oléate (Groupe II) ou 0,4 mM oléate + 0,6 mM octanoate (Groupe III).

VI.2.3 La cataplérose du citrate en conditions pathologiques : effet de l'hypertrophie

L'intérêt de mettre en relation la cataplérose du citrate et la maladie a été suscité par une série d'études réalisées sur des patients atteints de maladies des artères coronaires, démontrant une corrélation entre la quantité de citrate libéré par le myocarde et la sévérité de la maladie (*Nielsen et al., 1980; Bagger et al., 1981; Thomassen et al., 1983, Thuesen et al., 1984; Thomassen et al., 1989*). En outre, cette augmentation de la quantité de citrate libéré n'était pas corrélée avec la captation des acides gras, ce qui contrastait avec ce qui était observé chez des sujets sains (*Thomassen et al., 1983; Thomassen et al., 1989*). Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans la deuxième étude avec un modèle animal de pathologie cardiaque, soit les rats SHR âgés de 15 semaines, sont en accord avec ce qui a été rapporté par Thomassen et ses collaborateurs. En fait, une libération de citrate accrue (~3 fois) par les cœurs de rats SHR comparativement aux cœurs témoins des rats WKY a été observée. Par ailleurs, d'autres mesures effectuées en parallèle ont permis de dresser une vue d'ensemble du métabolisme altéré du cœur de rat SHR (Figure 6).

Premièrement, le phénotypage du métabolisme de ces cœurs à l'aide des substrats marqués au carbone 13 met clairement en évidence une diminution de la contribution de l'oléate exogène à la production d'énergie et une augmentation du flux glycolytique, tel que reflété par une libération de lactate non marqué dans l'effluent coronarien (flèche en trait pointillé). Ce réajustement du métabolisme énergétique dans le cœur hypertrophique est décrit dans la littérature comme un retour au phénotype métabolique fœtal. Par ailleurs, la contribution de la décarboxylation et de la carboxylation du pyruvate à la synthèse de citrate ne sont pas modifiées. Toutefois, l'anaplérose du pyruvate compense l'augmentation de la cataplérose du citrate. Finalement, la mesure des concentrations tissulaires des intermédiaires du CAC met en évidence une augmentation du citrate et une baisse de l' α -cétoglutarate, ce qui suggère que la capacité des cœurs SHR à métaboliser le citrate, et donc à produire de l'énergie, puisse être altérée.

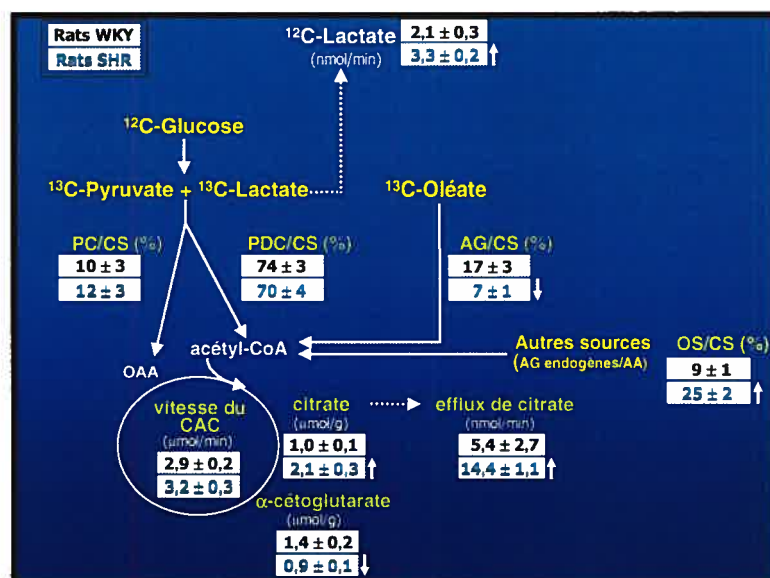


Figure 6. Phénotype métabolique du cœur perfusé *ex vivo* selon le modèle du « cœur au travail » : effets de l'hypertrophie cardiaque

Les cœurs de rats WKY et SHR âgés de 15 semaines ont été perfusés en présence de 5,5 mM glucose, 8 nM insuline, 1 mM [U- ^{13}C]lactate, 0,2 mM [U- ^{13}C]pyruvate, 0,4 mM [1- ^{13}C]oléate-4% albumine et 50 μM carnitine. PC/CS; contribution de la carboxylation du pyruvate à la réaction de la citrate synthase, PDC/CS; contribution de la décarboxylation du pyruvate à la réaction de la citrate synthase, AG/CS; contribution des acides gras à la réaction de la citrate synthase, OS/CS, contribution des autres sources de substrats endogènes à la réaction de la citrate synthase, AA; acides aminés. ↑; hausse significative $P < 0,05$, ↓; baisse significative $P < 0,05$.

Thomassen et ses collaborateurs ont proposé que l'augmentation de la sortie de citrate observée chez les patients cardiaques puisse s'expliquer par la réaction inverse de la NADP⁺-ICDH cytosolique. En fait, tout comme dans le foie et les glandes mammaires, les réactions catalysées par l'alanine aminotransférase, la NADP⁺-ICDH et l'aconitase dans le cytosol permettraient la formation du citrate à partir du glutamate (Thomassen *et al.*, 1983). Toutefois, tel que discuté précédemment, la contribution de la voie inverse de la NADP⁺-ICDH cytosolique à la formation de citrate cytosolique serait évaluée à au plus 20% et ce, même en condition d'ischémie partielle mimant l'hibernation, selon les résultats de la récente étude de Comte et ses collaborateurs (Comte, Vincent *et al.*, 2002 - présenté en Annexe 1). En outre, il est proposé que dans la mitochondrie, la formation du citrate par la réaction inverse de la NADP⁺-ICDH, estimée à ~5%, puisse avoir un rôle bénéfique de par le maintien du gradient de protons et de l'état redox. En effet, cette réaction forme de l'isocitrate et du NADP⁺, lequel serait utilisé conjointement avec du NADH par les H⁺-transhydrogénases permettant ainsi la formation de

NADPH et de NAD^+ (Comte *et al.*, 2002; Sazanov *et al.*, 1994). Dans une condition où l'apport en oxygène est limitant, cette régénération du NAD^+ pourrait s'avérer cruciale au maintien de l'activité du CAC. Ainsi, couplée à l'activité des H^+ -transhydrogénases, la réaction inverse de la NADP^+ -ICDH pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation de l'activité du CAC.

VI.2.4 Le citrate : une molécule signal?

Une des hypothèses formulées au début de ce travail de recherche concernait le rôle du citrate cytosolique comme molécule signal régulant l'utilisation des substrats pour la production d'énergie. Est-ce qu'un rôle de molécule signal dans le cytosol s'ajoute au rôle primaire et crucial du citrate comme premier intermédiaire du cycle de Krebs? Rappelons qu'il est proposé que le citrate cytosolique puisse réguler la glycolyse, via son rôle d'inhibiteur de la PFK, et l'oxydation des acides gras, via son métabolisme en malonyl-CoA, un inhibiteur de la CPT-I.

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans les trois manuscrits de cette thèse ne nous permettent pas d'énoncer des conclusions claires quant au rôle du citrate en tant que molécule signal régulant l'activité de la glycolyse dans le cœur. En effet, on se serait attendu à ce que les taux de libération de citrate dans les diverses conditions varient de façon inverse avec l'activité de la glycolyse. Toutefois, une telle relation n'est pas observée. Au contraire, les cœurs de rats SHR montrent une élévation parallèle des taux de cataplérose de citrate et de libération de lactate non marquée. D'autres études seraient nécessaires afin d'expliquer ces résultats qui sont en apparence contradictoires. Toutefois, tel que discuté précédemment à la section VI.1.1.1, il conviendrait de modifier la stratégie de marquage isotopique, puisque celle utilisée dans cette thèse ne permettait pas de mesurer directement la contribution de la glycolyse à la formation du pyruvate tissulaire. Par ailleurs, l'interprétation des données devrait tenir compte de la compartimentation possible du pyruvate, ainsi que la contribution relative des non-cardiomyocytes (fibroblastes et cellules endothéliales) et des cardiomyocytes à l'activité glycolytique du cœur. Elle devrait également tenir compte du fait que la libération du citrate pourrait être limitée par l'activité du transporteur de la membrane cytoplasmique dont l'identité reste inconnue.

Quant à la possibilité que le citrate cytosolique soit le précurseur métabolique du malonyl-CoA suite à son clivage en OAA et acétyl-CoA par l'ACL, rappelons que qu'il est également proposé que l'acétyl-CoA mitochondrial produit par la PDH soit transféré dans le cytosol par l'action de la carnitine acétyltransférase et de la carnitine-acylcarnitine translocase (Lysiak et al., 1986; Lopaschuk et al., 1994a). Les résultats de l'étude réalisée par Poirier et ses collaborateurs (Poirier, Vincent, Des Rosiers et al., 2002 - présentée en Annexe 1) suggèrent que le citrate soit impliqué, du moins partiellement, dans le transfert des unités acétyls de la mitochondrie au cytosol. Grâce à l'utilisation d'hydroxycitrate, un inhibiteur de l'ACL, et de substrats énergétiques marqués au carbone 13, cette étude a démontré que les unités acétyls provenant de l'oxydation des glucides et des lipides servent à la synthèse du malonyl-CoA dans le muscle cardiaque et que cette synthèse impliquerait l'ACL. Toutefois, les résultats de cette étude n'excluent pas une contribution de la voie de l'acétylcarnitine dans le transfert des unités acétyls. Les deux voies pourraient être actives simultanément dans la cellule et leurs contributions relatives pourraient varier selon les conditions. Parmi les facteurs qui pourraient potentiellement moduler l'activité relative de ces deux voies, mentionnons la disponibilité en substrats anaplérotiques versus celle en acétyl-CoA, et la régulation de l'ACL. D'autres études sont nécessaires afin de clarifier le rôle respectif de ces deux voies dans la formation de l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse du malonyl-CoA.

VI.2.5 Autres rôles potentiels de la cataplérose du citrate mitochondrial

Contrairement aux cellules- β , il n'y a dans le cœur aucune évidence pour la présence d'une navette pyruvate/citrate permettant de réoxyder du NADH cytosolique et de produire du NADPH cytosolique. Précisément, il n'y a pas d'évidence que l'enzyme malique cytosolique soit active dans le cœur, tel que reflété par l'absence d'isotopomères de masse M1 et M2 dans le pyruvate. Par contre, dans le cœur, un tel système de navette serait plutôt retrouvé au niveau du malate/citrate. De fait, grâce au transporteur mitochondrial du citrate et du malate, la libération de citrate de la mitochondrie au cytosol, suivit de son clivage en OAA, par ATP-citrate lyase, pourrait permettre grâce à la malate déshydrogénase une réoxydation du NADH cytosolique et par le fait même une consommation de H^+ du

cytosol. Par la suite, l'entrée de malate, du cytosol à l'intérieur de la mitochondrie, pourrait servir comme source de carbones anaplérotiques.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ne nous permettent pas de confirmer ou d'infirmier le rôle du citrate cytosolique comme molécule signal régulant la sélection des substrats. Par ailleurs, certains résultats soulèvent divers questionnements sur le processus de cataplérose du citrate mitochondrial. Spécifiquement, comment expliquer qu'une hausse de la concentration exogène en acides gras de 0,4 à 1 mM n'augmente pas la libération de citrate dans l'effluent des cœurs de rats perfusés « au travail » avec un mélange de substrats physiologiques? Est-ce qu'un rôle intercellulaire signalétique pourrait être envisagé pour le citrate retrouvé dans le milieu extra-cellulaire? Par ailleurs, comment expliquer la libération de citrate accrue des cœurs de rats SHR? Bien que d'autres études soient nécessaires pour répondre à ces questions, les explications suivantes sont proposées à titre spéculatif.

Concernant l'absence d'une augmentation de la libération de citrate suite à une hausse de la concentration en acides gras exogènes, une explication serait que l'activité du transporteur de citrate dans la membrane plasmique est limitante. Une autre explication serait que le clivage du citrate par l'ACL cytosolique soit augmenté. Toutefois, cette possibilité semble exclue puisque l'activité de cette enzyme devrait être réduite par la disponibilité restreinte en CoA, lequel serait plutôt utilisé pour l'activation des acides gras à chaîne longue. En fait, il est davantage probable que l'absence d'augmentation de libération de citrate s'explique par le fait que la cataplérose du citrate mitochondrial dans le cœur soit déjà maximale en présence d'un mélange de substrats physiologiques incluant l'oléate à une concentration de 0,4 mM. Cette explication serait en accord avec la concentration tissulaire plus élevée en citrate, lequel se retrouve majoritairement dans la mitochondrie, dans les cœurs perfusés en présence d'oléate à 1 mM qu'en présence d'oléate à 0,4 mM (Figure 4). Fait intéressant, cette augmentation du citrate tissulaire observée après 30 min de perfusion représente une accumulation nette de 5 nmol/min, alors que la vitesse de libération du citrate est de ~14 nmol/min.

Bien qu'il y ait peu d'informations dans la littérature sur la régulation de l'activité du transporteur de citrate mitochondrial, selon Srere (*Srere, 1992*) l'activité du transporteur serait couplée étroitement à celle de la citrate synthase. Ainsi, l'activité de ce transporteur pourrait participer à la régulation de la concentration tissulaire de citrate en s'ajustant à la vitesse de synthèse du citrate. Dans ce contexte, il est intéressant de mentionner les résultats de Panchal et ses collaborateurs obtenus dans des cœurs de cochons *in situ* (*Panchal et al., 2001*). Dans une condition d'ischémie partielle imitant l'hibernation, les données révèlent que le cœur libère environ cinq fois moins de citrate comparativement aux cœurs témoins. Parallèlement, les vitesses de carboxylation du pyruvate et du CAC sont aussi réduites de plus de 30%, alors que la vitesse de décarboxylation du pyruvate et la concentration tissulaire de citrate demeurent inchangées (*Panchal et al., 2000; Panchal et al., 2001*). Dans la discussion de leur publication (*Panchal et al., 2001*), ces auteurs mettent l'accent sur l'inter-régulation pouvant exister entre l'anaplérose du pyruvate et la cataplérose du citrate, dans la régulation du niveau de citrate tissulaire. Toutefois, selon les résultats obtenus dans la troisième étude de cette thèse, cette régulation pourrait bien être limitée par l'activité du transporteur mitochondrial de citrate.

Quelle pourrait être la conséquence d'une cataplérose limitée du citrate dans le cœur dans des conditions où l'apport en acides gras exogènes est augmenté? À cet égard, il convient de rappeler que dans la première étude, l'ajout de 1,2,3-BTC avait augmenté la libération de la LDH dans l'effluent coronarien. Bien que ce résultat reste à être expliqué, à titre spéculatif mentionnons que l'accumulation de citrate, qui est un chélateur de calcium et de magnésium, pourrait perturber l'homéostasie ionique de la mitochondrie. Au contraire, la cataplérose mitochondriale du citrate, laquelle s'effectue en échange d'une molécule de malate, est accompagnée d'un proton, ce qui devrait augmenter le potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale. Il est clair que d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre les autres rôles possibles de la cataplérose du citrate mitochondrial avant de pouvoir expliquer la hausse de la libération de citrate par les cœurs hypertrophiques.

CHAPITRE VII :

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les recherches réalisées au cours de cette thèse de doctorat ont permis de vérifier la majorité des hypothèses de départ. Cette étude est, à notre connaissance, la première à caractériser le processus de libération du citrate dans le cœur intact, tant sain que malade. Spécifiquement, les résultats obtenus au cours de cette thèse ont démontré, entre autres, que l'efflux de citrate par le cœur de rat perfusé *ex vivo* en condition normoxique est un processus métabolique qui est spécifique, régulé, et qui reflète l'efflux du citrate de la mitochondrie au cytosol. La cataplérose du citrate est modulée par (i) la demande énergétique, (ii) la nature et la concentration des substrats énergétiques disponibles pour la réaction de la citrate synthase, (iii) la condition (patho)physiologique de l'organe, ainsi que (iv) la présence d'un inhibiteur du transporteur mitochondrial des acides tricarboxyliques. Ne représentant que 0,3 à 2% de l'activité totale du CAC, cette cataplérose du citrate est accord avec (i) son rôle crucial de premier intermédiaire du CAC pour la production d'énergie, (ii) la faible activité du transporteur mitochondrial de citrate, (iii) un rôle de molécule signal dans le cytosol régulant la sélection des substrats énergétiques, de même que (iv) les résultats d'études réalisées *in situ* chez le cochon et *in vivo* chez l'humain. De plus, comme la cataplérose du citrate représente au plus 16% de la vitesse de carboxylation du pyruvate, cette fuite de carbones catalytiques par le CAC est largement compensée par l'anaplérose. En outre, en présence de mélanges de substrats physiologiques, la libération de citrate semble maximale, possiblement limitée par la faible activité du transporteur mitochondrial et/ou plasmatique.

Somme toute, grâce à la fine pointe de nos outils méthodologiques, une élégante étude de phénotypage métabolique et fonctionnel d'un cœur sain et d'un cœur malade a été réalisée. Par ailleurs, les résultats des recherches de cette thèse soulèvent de nouveaux questionnements. D'une part, d'autres expérimentations pourraient être réalisées dans le but d'obtenir des évidences directes appuyant le rôle du citrate dans les divers mécanismes de sélection des substrats pour la production d'énergie, c'est-à-dire en tant qu'inhibiteur direct de la glycolyse et indirect de la β -oxydation des acides gras. Étant donné l'intérêt clinique actuel pour des agents thérapeutiques impliqués dans la régulation de l'oxydation des acides gras (McLellan *et al.*, 1999; Kantor *et al.*, 2000; Wolff *et al.*, 2002; Lopaschuk, 2001b), il s'avèrerait d'autant plus pertinent de clarifier le rôle du citrate cytosolique comme précurseur du malonyl-CoA. Dans ce contexte, bien qu'à l'heure actuelle

une inhibition de la malonyl-CoA décarboxylase s'avère la stratégie proposée pour augmenter la concentration tissulaire du malonyl-CoA, une autre stratégie serait d'augmenter la cataplérose du citrate mitochondrial et son clivage ultérieur dans le cytosol en acétyl-CoA, puis en malonyl-CoA. Très peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur l'ACL dans le cœur. Il est donc à prévoir que les études futures devront clarifier la régulation de cette enzyme. De plus, ces études nécessiteront l'analyse du marquage de la molécule de malonyl-CoA, tel que décrit par Poirier et ses collaborateurs (*Poirier et al., 2002*), suivie de l'analyse de la distribution des isotopomères de masse de la molécule de citrate, parallèlement à des analyses quantitatives du citrate et du malonyl-CoA, et ce, dans diverses conditions de substrats physiologiques marqués au carbone 13.

D'autre part, une documentation plus complète du processus de cataplérose du citrate dans la pathologie de l'hypertension et de l'hypertrophie cardiaque pourrait permettre d'expliquer les causes de la hausse de libération de citrate chez les rats SHR de même que chez les patients souffrants de maladies coronariennes. Spécifiquement, dans le but de bien suivre la progression de la maladie, des cœurs de rats SHR âgés de 6, 15 et 30 semaines pourraient être perfusés dans des conditions de pressions reflétant l'état physiologique et en présence de mélanges de substrats énergétiques s'apparentant à des conditions post-prandiales et de jeûne.

En conclusion, l'utilisation d'isotopes stables combinés à l'analyse des isotopomères de masse par CGSM a permis de sonder le métabolisme énergétique cardiaque de façon très précise. Cette étude met en évidence pour la première fois une cataplérose de citrate dans un cœur intact, laquelle est compatible avec l'activité du transporteur de citrate mitochondrial ce qui est en accord avec le rôle du citrate cytosolique en tant que molécule signal régulant l'utilisation des substrats énergétiques. Une meilleure compréhension des mécanismes de production d'énergie et de leur modulation à court et à long terme par la pathologie pourrait permettre de suggérer et de développer de nouvelles interventions métaboliques et pharmacologiques pour améliorer le statut métabolique des cœurs malades.

CHAPITRE VIII : BIBLIOGRAPHIE

Abdel-aleem S, Nada MA, Sayed-Ahmed M, Hendrickson SC, St Louis J, Walthall HP and Lowe JE. Regulation of fatty acid oxidation by acetyl-CoA generated from glucose utilization in isolated myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28: 825-833, 1996.

Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G and Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1444-1449, 2000.

Allard MF, Schonekess BO, Henning SL, English DR and Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol* 267: H742-H750, 1994.

Argaud L and Ovize M. Myocardial metabolism abnormalities during ischemia and reperfusion. *Arch Mal Coeur Vaiss* 93: 87-90, 2000.

Awan MM and Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295 (Pt 1): 61-66, 1993.

Azzi A, Glerum M, Koller R, Mertens W and Spycher S. The mitochondrial tricarboxylate carrier. *J Bioenerg Biomembr* 25: 515-524, 1993.

Bagger JP, Toftegaard NT, Henningsen P, Thomsen PE and Eyjolfsson K. Myocardial release of citrate and lactate during atrial pacing-induced angina pectoris. *Scand J Clin Lab Invest* 41: 431-439, 1981.

Bagger JP, Thomassen A and Nielsen TT. Cardiac energy metabolism in patients with chest pain and normal coronary angiograms. *Am J Cardiol* 85: 315-320, 2000.

Ballard FB, Danforth WH, Naegle S and Bing RJ. Myocardial metabolism of fatty acids. *J Clin Invest* 39: 717-730, 1960.

Barger PM and Kelly DP. Fatty acid utilization in the hypertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms. *Am J Med Sci* 318: 36-42, 1999.

Barger PM and Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 10: 238-245, 2000.

Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ and Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest* 105: 1723-1730, 2000.

Barr RL and Lopaschuk GD. Direct measurement of energy metabolism in the isolated working rat heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 38: 11-17, 1997.

Barr RL and Lopaschuk GD. Methodology for measuring in vitro/ex vivo cardiac energy metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* 43: 141-152, 2000.

Bilheimer DW, Buja LM, Parkey RW, Bonte FJ and Willerson JT. Fatty acid accumulation and abnormal lipid deposition in peripheral and border zones of experimental myocardial infarcts. *J Nucl Med* 19: 276-283, 1978.

Bing RJ, Siegel A, Ungar I and Gilbert M. Metabolism of the human heart II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med* 16: 504-515, 1954.

Bing RJ. The metabolism of heart. *Harvey lect* 50: 27-70, 1955.

Bing RJ. Myocardial ischemia and infarction: growth of ideas. *Cardiovasc Res* 51: 13-20, 2001.

Bittl JA and Shine KI. Protection of ischemic rabbit myocardium by glutamic acid. *Am J Physiol* 245: H406-H412, 1983.

Blain J, Schaeffer H, Siegel A and Bing RJ. Studies of myocardial metabolism. *Am J Med* 20: 820-833, 1956.

Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith I and Watkins H. Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 10: 1215-1220, 2001.

Blau K and Halket JM. *Handbook of derivatives for chromatography.* John Wiley and Sons, 1993.

Boucher M and Ma J. Heart failure: is there a role for angiotensin II receptor blockers? *Issues Emerg Health Technol* 1-4, 2002.

Bristow M. Etomoxir: a new approach to treatment of chronic heart failure. *Lancet* 356: 1621-1622, 2000.

Broderick TL, Quinney HA, Barker CC and Lopaschuk GD. Beneficial effect of carnitine on mechanical recovery of rat hearts reperfused after a transient period of global ischemia is accompanied by a stimulation of glucose oxidation. *Circulation* 87: 972-981, 1993.

Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW and McGarry JD. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem* 270: 8952-8957, 1995.

Brunengraber H, Kelleher JK and Des Rosiers C. Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research. *Annu Rev Nutr* 17: 559-596, 1997.

Bunger R, Mallet RT and Hartman DA. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-

complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem* 180: 221-233, 1989.

Cairns CB, Ferroggiaro AA, Walther JM, Harken AH and Banerjee A. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 96: II-5, 1997.

Calvani M, Reda E and Arrigoni-Martelli E. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic Res Cardiol* 95: 75-83, 2000.

Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP and Lopaschuk GD. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 277: 4098-4103, 2002.

Ceremuzynski L, Budaj A, Czepiel A, Burzykowski T, Achremczyk P, Smielak-Korombel W, Maciejewicz J, Dziubinska J, Nartowicz E, Kawka-Urbanek T, Piotrowski W, Hanzlik J, Cieslinski A, Kawecka-Jaszcz K, Gessek J and Wrabec K. Low-dose glucose-insulin-potassium is ineffective in acute myocardial infarction: results of a randomized multicenter Pol-GIK trial. *Cardiovasc Drugs Ther* 13: 191-200, 1999.

Chambrier C, Riou J-P and Beylot M. *Les isotopes stables dans les études métaboliques en nutrition humaine*. Paris: Edition Arnette, 1988.

Chao J and Chao L. Kallikrein gene therapy: a new strategy for hypertensive diseases. *Immunopharmacology* 36: 229-236, 1997.

Chappell B and Haaroff KN. In: Biochemistry of mitochondria, London: Slater EC, Kaniuga Z, Wojtczak L, eds. Academic Press - Polish Scientific Publishers, 1967, p. 75-91.

Chatham JC, Des Rosiers C and Forder JR. Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E794-E802, 2001.

Chatham JC and Blackband SJ. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and imaging in animal research. *ILAR J* 42: 189-208, 2001.

Cheema-Dhadli S, Robinson BH and Halperin ML. Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can J Biochem* 54: 561-565, 1976.

Cheung PY, Danial H, Jong J and Schulz R. Thiols protect the inhibition of myocardial aconitase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 350: 104-108, 1998.

Clarke K, O'Connor AJ and Willis RJ. Temporal relation between energy metabolism and myocardial function during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 253: H412-H421, 1987.

Colonna P and Iliceto S. Myocardial infarction and left ventricular remodeling: results of the CEDIM trial. Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico. *Am Heart J* 139: S124-S130, 2000.

Comte B, Vincent G, Bouchard B, Jette M, Cordeau S and Des Rosiers C. A ¹³C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997.

Comte B, Vincent G, Bouchard B and Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997.

Comte B, Vincent G, Bouchard B, Benderdour M and Des Rosiers C. Reverse flux through cardiac NADP(+)-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1505-H1514, 2002.

Cook GA. Differences in the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase to inhibition by malonyl-CoA are due to differences in K_i values. *J Biol Chem* 259: 12030-12033, 1984.

Corr PB, Gross RW and Sobel BE. Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ Res* 55: 135-154, 1984.

Davila-Roman VG, Vedala G, Herrero P, de las FL, Rogers JG, Kelly DP and Gropler RJ. Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 40: 271-277, 2002.

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

Depre C, Shipley G, Davies P, Frazier O and Taegtmeyer H. Glucose Transporter isoform expression in the failing human heart. *Circulation* 98: I-627, 1998.

Depre C, Davies PJ and Taegtmeyer H. Transcriptional adaptation of the heart to mechanical unloading. *Am J Cardiol* 83: 58H-63H, 1999.

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

Des Rosiers C, Montgomery JA, Desrochers S, Garneau M, David F, Mamer OA and Brunengraber H. Interference of 3-hydroxyisobutyrate with measurements of ketone body concentration and isotopic enrichment by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 173: 96-105, 1988.

Dhalla AK, Hill MF and Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 506-514, 1996.

Diaz R, Paolasso EA, Piegas LS, Tajer CD, Moreno MG, Corvalan R, Isea JE and Romero G. Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA (Estudios Cardiológicos Latinoamérica) Collaborative Group. *Circulation* 98: 2227-2234, 1998.

Dyck JR, Barr AJ, Barr RL, Kolattukudy PE and Lopaschuk GD. Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation. *Am J Physiol* 275: H2122-H2129, 1998.

Dyck JR, Kudo N, Barr AJ, Davies SP, Hardie DG and Lopaschuk GD. Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur J Biochem* 262: 184-190, 1999.

Dyck JR and Lopaschuk GD. Malonyl CoA Control of Fatty Acid Oxidation in the Ischemic Heart. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1099, 2002.

Eaton S, Fukumoto K, Paladio DN, Pierro A, Spitz L, Quant PA and Bartlett K. Carnitine palmitoyl transferase I and the control of myocardial beta-oxidation flux. *Biochem Soc Trans* 29: 245-250, 2001.

Elangbam CS, Tyler RD and Lightfoot RM. Peroxisome proliferator-activated receptors in atherosclerosis and inflammation--an update. *Toxicol Pathol* 29: 224-231, 2001.

Escobar E. Hypertension and coronary heart disease. *J Hum Hypertens* 16 Suppl 1: S61-S63, 2002.

Evans RD, Bennett MJ and Hauton D. Perfused heart studies to investigate lipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 28: 113-120, 2000.

Faergeman NJ and Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 323 (Pt 1): 1-12, 1997.

Farfari S, Schulz V, Corkey B and Prentki M. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49: 718-726, 2000.

Fath-Ordoubadi F and Beatt KJ. Glucose-insulin-potassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebo-controlled trials. *Circulation* 96: 1152-1156, 1997.

Fawcett DW and McNutt NS. The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J Cell Biol* 42: 1-45, 1969.

Fernandez CA, Des Rosiers C, Previs SF, David F and Brunengraber H. Correction of ^{13}C mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance. *J Mass Spectrom* 31: 255-262, 1996.

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Percoco G, Toselli T and Antonioli G. Ischemic preconditioning, myocardial stunning, and hibernation: basic aspects. *Am Heart J* 138: S61-S68, 1999.

Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD and Kelly DP. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109: 121-130, 2002.

Fink G, Desrochers S, Des Rosiers C, Garneau M, David F, Daloze T, Landau BR and Brunengraber H. Pseudoketogenesis in the perfused rat heart. *J Biol Chem* 263: 18036-18042, 1988.

Freminet A, Leclerc L and Poyart C. Possible contribution of amino-acids in myocardium response to hypoxia. *J Physiol (Paris)* 76: 677-691, 1980.

Freminet A and Leclerc L. Simultaneous use of carbohydrates and amino acids during total ischemia in the isolated rat heart. *J Physiol (Paris)* 76: 893-899, 1980.

Freminet A, Leclerc L, Poyart C, Huel C and Gentil M. Alanine and succinate accumulation in the perfused rat heart during hypoxia. *J Physiol (Paris)* 76: 113-117, 1980.

Fruchart JC, Staels B and Duriez P. PPARS, metabolic disease and atherosclerosis. *Pharmacol Res* 44: 345-352, 2001.

Garland PB, Randle PJ and Newsholme EA. Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature* 200: 381, 1963.

Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC and Neese RA. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J Clin Invest* 82: 2017-2025, 1988.

Gibala MJ, Young ME and Taegtmeyer H. Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 168: 657-665, 2000.

Gilbertson JR. Cardiac Muscle. edited by Snyder F. New-York: Plenum, 1977, p. 367-397.

Glatz JF, Luiken JJ and Bonen A. Involvement of membrane-associated proteins in the acute regulation of cellular fatty acid uptake. *J Mol Neurosci* 16: 123-132, 2001.

Gollnick PD and Hermansen L. Biochemical adaptations to exercise: anaerobic metabolism. *Exerc Sport Sci Rev* 1: 1-43, 1973.

Goodwin GW and Taegtmeyer H. Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol* 277: E772-E777, 1999.

Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD and Kelly DP. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11012-11016, 1994.

H'Doubler PB, Jr., Peterson M, Shek W, Auchincloss H, Abbott WM and Orkin RW. Spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats are genetically disparate. *Lab Anim Sci* 41: 471-473, 1991.

Hamilton C and Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J* 350 Pt 1: 61-67, 2000.

Hauton D, Bennett MJ and Evans RD. Utilisation of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochim Biophys Acta* 1533: 99-109, 2001.

Hazey JW, Yang D, Powers L, Previs SF, David F, Beaulieu AD, Puchowicz MA, Potter JL, Palmquist DL and Brunengraber H. Tracing gluconeogenesis with deuterated water: measurement of low deuterium enrichments on carbons 6 and 2 of glucose. *Anal Biochem* 248: 158-167, 1997.

Hendrickson SC, St Louis JD, Lowe JE and Abdel-aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 166: 85-94, 1997.

Henze E, Schelbert HR, Barrio JR, Egbert JE, Hansen HW, MacDonald NS and Phelps ME. Evaluation of myocardial metabolism, with N-13- and C-11-labeled amino acids and positron computed tomography. *J Nucl Med* 23: 671-681, 1982.

Hermann HP, Pieske B, Schwarzmuller E, Keul J, Just H and Hasenfuss G. Haemodynamic effects of intracoronary pyruvate in patients with congestive heart failure: an open study. *Lancet* 353: 1321-1323, 1999.

Hickson-Bick DL, Buja ML and McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32: 511-519, 2000.

Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A and Harris DL. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* 30: 3576-3582, 1991.

Hochachka PW and Dressendorfer RH. Succinate accumulation in man during exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 35: 235-242, 1976.

Hopkins TA, Dyck JR and Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem Soc Trans* 31: 207-212, 2003.

Hu WY, Fukuda N and Kanmatsuse K. Growth characteristics, angiotensin II generation, and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 20: 1323-1333, 2002.

Hue L, Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Horman S and Rider MH. Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1091-1097, 2002.

Huizing M, Ruitenbeek W, van den Heuvel LP, Dolce V, Iacobazzi V, Smeitink JA, Palmieri F and Trijbels JM. Human mitochondrial transmembrane metabolite carriers: tissue distribution and its implication for mitochondrial disorders. *J Bioenerg Biomembr* 30: 277-284, 1998.

Humphries KM and Szweda LI. Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37: 15835-15841, 1998.

Jamshidi Y, Montgomery HE, Hense HW, Myerson SG, Torra IP, Staels B, World MJ, Doering A, Erdmann J, Hengstenberg C, Humphries SE, Schunkert H and Flavell DM. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension. *Circulation* 105: 950-955, 2002.

Janiger JL and Cheng JW. Glucose-insulin-potassium solution for acute myocardial infarction. *Ann Pharmacother* 36: 1080-1084, 2002.

Jankowski M, Rachelska G, Donghao W, McCann SM and Gutkowska J. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11765-11770, 2001.

Jeffrey FM, Storey CJ, Sherry AD and Malloy CR. ^{13}C isotopomer model for estimation of anaplerotic substrate oxidation via acetyl-CoA. *Am J Physiol* 271: E788-E799, 1996.

Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S and Reimer KA. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol* 92: 187-214, 1978.

Jennings RB, Reimer KA, Hill ML and Mayer SE. Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res* 49: 892-900, 1981.

Jessen ME, Kovarik TE, Jeffrey FM, Sherry AD, Storey CJ, Chao RY, Ring WS and Malloy CR. Effects of amino acids on substrate selection, anaplerosis, and left ventricular function in the ischemic reperfused rat heart. *J Clin Invest* 92: 831-839, 1993.

Kantor PF, Dyck JR and Lopaschuk GD. Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart. *Am J Med Sci* 318: 3-14, 1999.

Kantor PF, Lucien A, Kozak R and Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res* 86: 580-588, 2000.

Kauppinen RA, Hiltunen JK and Hassinen IE. Compartmentation of citrate in relation to the regulation of glycolysis and the mitochondrial transmembrane proton electrochemical potential gradient in isolated perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta* 681: 286-291, 1982.

Kelly DP and Strauss AW. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* 330: 913-919, 1994.

Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha as a genetic determinant of cardiac hypertrophic growth: culprit or innocent bystander? *Circulation* 105: 1025-1027, 2002.

Keul HA, Doll E, Streim H and Reindell H. *Pflugers Arch Ges Physiol* 282: 1-27, 1965.

Kien CL, Murray RD, Ailabouni A, Powers P, Kepner J, Powers L and Brunengraber H. Stable isotope model for assessing production of short chain fatty acids from colon-derived sugar: application in pigs. *J Nutr* 126: 3069-3076, 1996.

Kim JY, Koves TR, Yu GS, Gulick T, Cortright RN, Dohm GL and Muoio DM. Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1014-E1022, 2002.

Kornberg HL. Anaplerosis sequences and their role in metabolism. In: *Essays in Biochemistry*, PN Campbell & RD Marshall, Academic Press, London, 1966, p. 1-31.

Krebs HA, Williamson DH, Bates MW, Page MA and Hawkins RA. The role of ketone bodies in caloric homeostasis. In: *Advances in enzyme regulations*, edited by Weber G. New York: Pergamon Press, 1971, p. 387-409.

Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S and Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 270: 17513-17520, 1995.

Kurtz TW and Morris RC, Jr. Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 10: 127-131, 1987.

Langendorff O. *Gesamte Physiol Menschen Tiere* 61: 291-332, 1895.

Laplante A, Vincent G, Poirier M and Des Rosiers C. Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A ^{13}C mass isotopomer study. *Am J Physiol* 272: E74-E82, 1997.

Large V, Brunengraber H, Odeon M and Beylot M. Use of labeling pattern of liver glutamate to calculate rates of citric acid cycle and gluconeogenesis. *Am J Physiol* 272: E51-E58, 1997.

Lee W.N.P., Whiting J.S., Fymat A.L. and Boettger H.G. *Biomedical Mass Spec* 641-645, 1983.

Lehman JJ and Kelly DP. Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. *Heart Fail Rev* 7: 175-185, 2002.

Lerch R. Oxidative substrate metabolism during postischemic reperfusion. *Basic Res Cardiol* 88: 525-544, 1993.

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J and Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1065-1089, 2001.

Lewandowski ED and White LT. Pyruvate dehydrogenase influences postischemic heart function. *Circulation* 91: 2071-2079, 1995.

Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Mortensen RM and Tian R. Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice. *Circulation* 106: 2125-2131, 2002.

Liedtke AJ. Alterations of carbohydrate and lipid metabolism in the acutely ischemic heart. *Prog Cardiovasc Dis* 23: 321-336, 1981.

Liu GX, Hanley PJ, Ray J and Daut J. Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart. *Circ Res* 88: 918-924, 2001.

Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J and Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res* 45: 729-735, 2000.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaire P, Baltimore D and Darnell JE. *Molecular Cell Biology*. New York: W H Freeman & Co, 4th ed., 2000.

Longnus SL, Wambolt RB, Barr RL, Lopaschuk GD and Allard MF. Regulation of myocardial fatty acid oxidation by substrate supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1561-H1567, 2001.

Lopaschuk GD, Wambolt RB and Barr RL. An imbalance between glycolysis and glucose oxidation is a possible explanation for the detrimental effects of high levels of fatty acids during aerobic reperfusion of ischemic hearts. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 135-144, 1993.

Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T and Schonekess BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1213: 263-276, 1994.

Lopaschuk GD and Gamble J. The 1993 Merck Frosst Award. Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1101-1109, 1994.

Lopaschuk GD and Barr RL. Measurements of fatty acid and carbohydrate metabolism in the isolated working rat heart. *Mol Cell Biochem* 172: 137-147, 1997.

Lopaschuk GD. Optimizing cardiac energy metabolism: how can fatty acid and carbohydrate metabolism be manipulated? *Coron Artery Dis* 12 Suppl 1: S8-11, 2001.

Lopaschuk GD. Trimetazidine in AMI. *Eur Heart J* 22: 977-978, 2001.

Lopaschuk GD, Rebeyka IM and Allard MF. Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation* 105: 140-142, 2002.

Lopaschuk GD and Opie LH. Introduction to JMCC symposium on myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1075-1076, 2002.

Lopez AP and Murray CCJL. The global burden of disease, 1990-2020. *Nature Med* 4: 1240-1243, 1998.

Lucas DT and Szweda LI. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 510-514, 1998.

Luiken JJ, Miskovic D, Arumugam Y, Glatz JF and Bonen A. Skeletal muscle fatty acid transport and transporters. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 11 Suppl: S92-S96, 2001.

Lydell CP, Chan A, Wambolt RB, Sambandam N, Parsons H, Bondy GP, Rodrigues B, Popov KM, Harris RA, Brownsey RW and Allard MF. Pyruvate dehydrogenase and the regulation of glucose oxidation in hypertrophied rat hearts. *Cardiovasc Res* 53: 841-851, 2002.

Lysiak W, Toth PP, Suelter CH and Bieber LL. Quantitation of the efflux of acylcarnitines from rat heart, brain, and liver mitochondria. *J Biol Chem* 261: 13698-13703, 1986.

Mallet RT and Sun J. Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res* 42: 149-161, 1999.

Mallet RT. Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proc Soc Exp Biol Med* 223: 136-148, 2000.

Malloy CR, Sherry AD and Jeffrey FM. Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ^{13}C NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 263: 6964-6971, 1988.

Mamer OA. Measurement of urinary lactic, 3-hydroxybutyric, pyruvic and acetoacetic acids in a single analysis selected ion monitoring and stable isotope labelling techniques. *Biomedical Mass Spec* 15: 57-62, 1988.

Mari C and Strauss WH. Detection and characterization of hibernating myocardium. *Nucl Med Commun* 23: 311-322, 2002.

Martini WZ, Stanley WC, Huang H, Des Rosiers C, Hoppel CL and Brunengraber H. Quantitative assessment of anaplerosis from propionate in pig heart in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E351-E356, 2003.

Mc Lafferty FW. *Interpretation of mass spectra.* Mill Valley, California: 1980.

McCormack JG, Barr RL, Wolff AA and Lopaschuk GD. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic, and reperfused ischemic rat hearts. *Circulation* 93: 135-142, 1996.

McGarry JD, Stark MJ and Foster DW. Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J Biol Chem* 253: 8291-8293, 1978.

McGarry JD and Foster DW. In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J Biol Chem* 254: 8163-8168, 1979.

McGarry JD, Mills SE, Long CS and Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* 214: 21-28, 1983.

McGarry JD, Woeltje KF, Kuwajima M and Foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab Rev* 5: 271-284, 1989.

McGarry JD and Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1-14, 1997.

McLellan KJ and Plsoker GL. Trimetazidine: A review of its use in stable angina pectoris and other coronary conditions. *Drugs* 58: 143-157, 1999.

McVeigh JJ and Lopaschuk GD. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. *Am J Physiol* 259: H1079-H1085, 1990.

Mitchell GA, Kassojska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L, Lambert M, Lapierre P and Potier E. Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin Invest Med* 18: 193-216, 1995.

Montessuit C and Thorburn A. Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists. *J Biol Chem* 274: 9006-9012, 1999.

Moore MA. Choosing initial antihypertensive drug therapy for the uncomplicated hypertensive patient. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 3: 37-44, 2001.

Moule SK, Edgell NJ, Borthwick AC and Denton RM. Coenzyme A is a potent inhibitor of acetyl-CoA carboxylase from rat epididymal fat-pads. *Biochem J* 283 (Pt 1): 35-38, 1992.

Mudge GH, Jr., Mills RM, Jr., Taegtmeier H, Gorlin R and Lesch M. Alterations of myocardial amino acid metabolism in chronic ischemic heart disease. *J Clin Invest* 58: 1185-1192, 1976.

Munroe PB, Knight J and Caulfield MJ. 1990-2000: progress in determining high blood pressure genes. *Ann Acad Med Singapore* 29: 357-363, 2000.

Myerson SG, Montgomery HE, Whittingham M, Jubb M, World MJ, Humphries SE and Pennell DJ. Left Ventricular Hypertrophy With Exercise and ACE Gene Insertion/Deletion Polymorphism : A Randomized Controlled Trial With Losartan. *Circulation* 103: 226-230, 2001.

Neely JR, Liebermeister H, Battersby EJ and Morgan HE. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol* 212: 804-814, 1967.

Neely JR and Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol* 36: 413-459, 1974.

Neely JR and Rovetto MJ. Techniques for perfusing isolated rat hearts. *Methods Enzymol* 39: 43-60, 1975.

Neely JR, Rovetto MJ and Whitmer JT. Rate-limiting steps of carbohydrate and fatty acid metabolism in ischemic hearts. *Acta Med Scand Suppl* 587: 9-15, 1976.

Nguyen VT, Mossberg KA, Tewson TJ, Wong WH, Rowe RW, Coleman GM and Taegtmeier H. Temporal analysis of myocardial glucose metabolism by 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Am J Physiol* 259: H1022-H1031, 1990.

Nichols CG and Cukras CA. K(ATP) channel regulators: balanced diets include carbohydrates, proteins, and fats. *Circ Res* 88: 849-851, 2001.

Nielsen TT, Henningsen P, Bagger JP, Thomsen PE and Eyjolfsson K. Myocardial citrate metabolism in control subjects and patients with coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 40: 575-580, 1980.

Nielsen TT. Plasma citrate in relation to glucose and free fatty acid metabolism in man. *Dan Med Bull* 30: 357-378, 1983.

Nogueira JB. Left ventricular hypertrophy in systemic hypertension. Benefits of its reversal. *Arq Bras Cardiol* 73: 103-112, 1999.

Nuutinen EM, Peuhkurinen KJ, Pietilainen EP, Hiltunen JK and Hassinen IE. Elimination and replenishment of tricarboxylic acid-cycle intermediates in myocardium. *Biochem J* 194: 867-875, 1981.

Opie LH. Fuels:aerobic & anaerobic metabolism. In: *The heart: Physiology, from Cell to Circulation.*, Philadelphia: Lippincott-Raven, Third Edition, 1998, p. 295-342.

Opie LH and Sack MN. Metabolic plasticity and the promotion of cardiac protection in ischemia and ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1077, 2002.

Oram JF, Bennetch SL and Neely JR. Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused rat hearts. *J Biol Chem* 248: 5299-5309, 1973.

Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR, Hintze TH, Lopaschuk GD and Recchia FA. Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation* 106: 606-612, 2002.

Owen OE, Kalhan SC and Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277: 30409-30412, 2002.

Panchal AR, Comte B, Huang H, Kerwin T, Darvish A, Des Rosiers C, Brunengraber H and Stanley WC. Partitioning of pyruvate between oxidation and anaplerosis in swine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2390-H2398, 2000.

Panchal AR, Comte B, Huang H, Dudar B, Roth B, Chandler M, Des Rosiers C, Brunengraber H and Stanley WC. Acute hibernation decreases myocardial pyruvate carboxylation and citrate release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1613-H1620, 2001.

Park EA and Cook GA. Differential regulation in the heart of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I muscle and liver isoforms. *Mol Cell Biochem* 180: 27-32, 1998.

Peuhkurinen KJ and Hassinen IE. Pyruvate carboxylation as an anaplerotic mechanism in the isolated perfused rat heart. *Biochem J* 202: 67-76, 1982.

Peuhkurinen KJ, Takala TE, Nuutinen EM and Hassinen IE. Tricarboxylic acid cycle metabolites during ischemia in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol* 244: H281-H288, 1983.

Peuhkurinen KJ. Regulation of the tricarboxylic acid cycle pool size in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 16: 487-495, 1984.

Phillips MI, Wielbo D and Gyurko R. Antisense inhibition of hypertension: a new strategy for renin-angiotensin candidate genes. *Kidney Int* 46: 1554-1556, 1994.

Phillips MI. Gene therapy for hypertension: the preclinical data. *Hypertension* 38: 543-548, 2001.

Piriou V, Lehot JJ, Obadia JF, Terrenoire C and Janier M . Myocardial stunning and myocardial hibernation: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth* 45: 997-1010, 1998.

Pisarenko OI, Studneva IM, Shulzhenko VS, Korchazhkina OV and Kapelko VI. Substrate accessibility to cytosolic aspartate aminotransferase improves posthypoxic recovery of isolated rat heart. *Biochem Mol Med* 55: 138-148, 1995.

Pisarenko OI. Mechanisms of myocardial protection by amino acids: facts and hypotheses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23: 627-633, 1996.

Plaut GW, Cook M and Aogaichi T. The subcellular location of isozymes of NADP-isocitrate dehydrogenase in tissues from pig, ox and rat. *Biochim Biophys Acta* 760: 300-308, 1983.

Poirier M, Vincent G, Reszko AE, Bouchard B, Kelleher JK, Brunengraber H and Des Rosiers C. Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1379-H1386, 2002.

Power GW and Newsholme EA. Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J Nutr* 127: 2142-2150, 1997.

Prentki M and Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45: 273-283, 1996.

Rafalowska U. Transport of malate and citrate into rat brain mitochondria under hypoxia and anesthesia. *Neurochem Res* 4: 355-364, 1979.

Rahimtoola SH. Coronary bypass surgery for chronic angina--1981. A perspective. *Circulation* 65: 225-241, 1982.

- Rahimtoola SH.** The hibernating myocardium. *Am Heart J* 117: 211-221, 1989.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN and Newsholme EA.** The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789, 1963.
- Randle PJ.** Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14: 263-283, 1998.
- Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH and Taegtmeyer H.** Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* 104: 2923-2931, 2001.
- Razeghi P, Young ME, Abbasi S and Taegtmeyer H.** Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 5-10, 2001.
- Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML and Jennings RB .** Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 251: H1306-H1315, 1986.
- Reszko AE, Kasumov T, Comte B, Pierce BA, David F, Bederman IR, Deutsch J, Des Rosiers C and Brunengraber H.** Assay of the concentration and ¹³C-isotopic enrichment of malonyl-coenzyme A by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 298: 69-75, 2001.
- Rizos I.** Three-year survival of patients with heart failure caused by dilated cardiomyopathy and L-carnitine administration. *Am Heart J* 139: S120-S123, 2000.
- Robinson BH and Oei J.** Citrate transport in guinea pig heart mitochondria. *Can J Biochem* 53: 643-647, 1975.

Robinson BH, Oei J, Cheema-Dhadli S and Halperin ML. Regulation of citrate transport and pyruvate dehydrogenase in rat kidney cortex mitochondria by bicarbonate. *J Biol Chem* 252: 5661-5665, 1977.

Rocchiccioli F. Spectrométrie de masse dans les maladies métaboliques de l'enfant. *médecine/sciences* 5(9), 645-653. 1989.

Rodgers RL, Christe ME, Tremblay GC, Babson JR and Daniels T. Insulin-like effects of a physiologic concentration of carnitine on cardiac metabolism. *Mol Cell Biochem* 226: 97-105, 2001.

Roe CR and Coates PM. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, New York: Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, Valle D, eds. McGraw-Hill, 1995, p. 1501-1533.

Ruderman NB, Ross PS, Berger M and Goodman MN. Regulation of glucose and ketone-body metabolism in brain of anaesthetized rats. *Biochem J* 138: 1-10, 1974.

Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D and Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1-E18, 1999.

Ruilope L and Jager B. Eprosartan for the treatment of hypertension. *Expert Opin Pharmacother* 4: 107-114, 2003.

Rupp H and Jacob R. Metabolically-modulated growth and phenotype of the rat heart. *Eur Heart J* 13 Suppl D: 56-61, 1992.

Russell RR III and Taegtmeyer H. Pyruvate carboxylation prevents the decline in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *Am J Physiol* 261: H1756-H1762, 1991.

Russell RR III, Mommessin JI and Taegtmeyer H. Propionyl-L-carnitine-mediated improvement in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. *Am J Physiol* 268: H441-H447, 1995.

Saburi Y, Okumura K, Matsui H, Hayashi K, Kamiya H, Takahashi R, Matsubara K and Ito M. Changes in distinct species of 1,2-diacylglycerol in cardiac hypertrophy due to energy metabolic disorder. *Cardiovasc Res* 57: 92-100, 2003.

Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA and Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94: 2837-2842, 1996.

Sack MN and Kelly DP. The energy substrate switch during development of heart failure: gene regulatory mechanisms (Review). *Int J Mol Med* 1: 17-24, 1998.

Sacksteder KA, Morrell JC, Wanders RJ, Matalon R and Gould SJ. MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J Biol Chem* 274: 24461-24468, 1999.

Saddik M, Gamble J, Witters LA and Lopaschuk GD. Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem* 268: 25836-25845, 1993.

Sadek HA, Humphries KM, Szweda PA and Szweda LI. Selective inactivation of redox-sensitive mitochondrial enzymes during cardiac reperfusion. *Arch Biochem Biophys* 406: 222-228, 2002.

Safer B and Williamson JR. Mitochondrial-cytosolic interactions in perfused rat heart. Role of coupled transamination in repletion of citric acid cycle intermediates. *J Biol Chem* 248: 2570-2579, 1973.

Safer B. The Metabolic Significance of the Malate-Aspartate Cycle in Heart. *Circ Res* 37: 527-533, 1975.

Saggerson D, Ghadiminejad I and Awan M. Regulation of mitochondrial carnitine palmitoyl transferases from liver and extrahepatic tissues. *Adv Enzyme Regul* 32: 285-306, 1992.

Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazidis A, Witters LA, Shafrir E and Ruderman NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol* 272: E641-E648, 1997.

Saha AK, Laybutt DR, Dean D, Vavvas D, Sebokova E, Ellis B, Klimes I, Kraegen EW, Shafrir E and Ruderman NB. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am J Physiol* 276: E1030-E1037, 1999.

Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW and Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* 7: 161-173, 2002.

Sazanov LA and Jackson JB. Proton-translocating transhydrogenase and NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria. *FEBS Lett* 344: 109-116, 1994.

Schaap FG, van der Vusse GJ and Glatz JF. Fatty acid-binding proteins in the heart. *Mol Cell Biochem* 180: 43-51, 1998.

Schiller CM, Taylor WM and Halperin ML. Control of fatty acid synthesis in white adipose tissue by insulin: coordination between the mitochondrial citrate transporter and pyruvate dehydrogenase. *Can J Biochem* 52: 814-821, 1974.

Scholte HR. The intracellular and intramitochondrial distribution of malonyl-CoA decarboxylase and propionyl-CoA carboxylase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 178: 137-144, 1969.

Schonekess BO, Allard MF and Lopaschuk GD. Propionyl L-carnitine improvement of hypertrophied heart function is accompanied by an increase in carbohydrate oxidation. *Circ Res* 77: 726-734, 1995.

Schoonderwoerd K, Broekhoven-Schokker S, Hulsmann WC and Stam H. Enhanced lipolysis of myocardial triglycerides during low-flow ischemia and anoxia in the isolated rat heart. *Basic Res Cardiol* 84: 165-173, 1989.

Seidman JG and Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 104: 557-567, 2001.

Seymour AM and Chatham JC. The effects of hypertrophy and diabetes on cardiac pyruvate dehydrogenase activity. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2771-2778, 1997.

Simpson IA and Cushman SW. Hormonal regulation of mammalian glucose transport. *Annu Rev Biochem* 55: 1059-1089, 1986.

Sluse FE, Meijer AJ and Tager JM. Anion translocators in rat-heart mitochondria. *FEBS Lett* 18: 149-153, 1971.

Sodi-Pallares D, Testelli M and Fishelder F. Effects of an intravenous infusion of a potassium-insulin-glucose solution on electrocardiographic signs of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 9: 166-181, 1962.

Srere PA. The molecular physiology of citrate. *Curr Top Cell Regul* 33: 261-275, 1992.

Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38: 1124-1144, 1989.

Stanley WC, Hernandez LA, Spires D, Bringas J, Wallace S and McCormack JG. Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: effects of dichloroacetate. *J Mol Cell Cardiol* 28: 905-914, 1996.

Stanley WC, Lopaschuk GD and McCormack JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res* 34: 25-33, 1997.

Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL and McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 33: 243-257, 1997.

Stanley WC and Chandler MP. Energy metabolism in the normal and failing heart: potential for therapeutic interventions. *Heart Fail Rev* 7: 115-130, 2002.

Sugden MC, Bulmer K and Holness MJ. Fuel-sensing mechanisms integrating lipid and carbohydrate utilization. *Biochem Soc Trans* 29: 272-278, 2001.

Sundqvist KE, Vuorinen KH, Peuhkurinen KJ and Hassinen IE. Metabolic effects of propionate, hexanoate and propionylcarnitine in normoxia, ischaemia and reperfusion. Does an anaplerotic substrate protect the ischaemic myocardium? *Eur Heart J* 15: 561-570, 1994.

Surendran S, Sacksteder KA, Gould SJ, Coldwell JG, Rady PL, Tyring SK and Matalon R. Malonyl CoA decarboxylase deficiency: C to T transition in intron 2 of the MCD gene. *J Neurosci Res* 65: 591-594, 2001.

Swislocki AL, LaPier TL, Khuu DT, Fann KY, Tait M and Rodnick KJ. Metabolic, hemodynamic, and cardiac effects of captopril in young, spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 12: 581-589, 1999.

Sztark F, Payen JF, Piriou V, Rigoulet M, Ventura-Clapier R, Mazat JP, Leverve X and Janvier G. Cellular energy metabolism: physiologic and pathologic aspects. *Ann Fr Anesth Reanim* 18: 261-269, 1999.

Taegtmeyer H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ Res* 43: 808-815, 1978.

Taegtmeyer H, Hems R and Krebs HA. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart. *Biochem J* 186: 701-711, 1980.

Taegtmeyer H. On the inability of ketone bodies to serve as the only energy providing substrate for rat heart at physiological work load. *Basic Res Cardiol* 78: 435-450, 1983.

Taegtmeyer H. Carbohydrate interconversions and energy production. *Circulation* 72: IV1-IV8, 1985.

Taegtmeyer H and Passmore JM. Defective energy metabolism of the heart in diabetes. *Lancet* 1: 139-141, 1985.

Taegtmeyer H and Overturf ML. Effects of moderate hypertension on cardiac function and metabolism in the rabbit. *Hypertension* 11: 416-426, 1988.

Taegtmeyer H. One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism. *Can J Cardiol* 11: 1030-1035, 1995.

Taegtmeyer H and Dietze GJ. Perspective: from increased energy metabolism to cardiac hypertrophy and failure: mediators and molecular mechanisms. *Am J Cardiol* 83: 1H-2H, 1999.

Taegtmeyer H. Genetics of energetics: transcriptional responses in cardiac metabolism. *Ann Biomed Eng* 28: 871-876, 2000.

Taegtmeyer H. Metabolism--the lost child of cardiology. *J Am Coll Cardiol* 36: 1386-1388, 2000.

Taegtmeyer H. Switching metabolic genes to build a better heart. *Circulation* 106: 2043-2045, 2002.

Taegtmeyer H, Razeghi P and Young ME. Mitochondrial proteins in hypertrophy and atrophy: a transcript analysis in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 346-350, 2002.

Takala T, Hiltunen JK and Hassinen IE. The mechanism of ammonia production and the effect of mechanical work load on proteolysis and amino acid catabolism in isolated perfused rat heart. *Biochem J* 192: 285-295, 1980.

Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P and deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 34: 229-235, 1999.

Tea BS, Der SS, Touyz RM, Hamet P and deBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 35: 1069-1073, 2000.

Thampy KG. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J Biol Chem* 264: 17631-17634, 1989.

Thomassen A, Nielsen TT, Bagger JP and Henningsen P. Cardiac metabolic and hemodynamic effects of insulin in patients with coronary artery disease. *Diabetes* 38: 1175-1180, 1989.

Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP and Henningsen P. Myocardial exchanges of glutamate, alanine and citrate in controls and patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 64: 33-40, 1983.

Thuesen L, Nielsen TT, Thomassen A, Bagger JP and Henningsen P. Beneficial effect of a low-fat low-calorie diet on myocardial energy metabolism in patients with angina pectoris. *Lancet* 2: 59-62, 1984.

Tokoro T, Ito H and Suzuki T. Alterations in mitochondrial DNA and enzyme activities in hypertrophied myocardium of stroke-prone SHR. *Clin Exp Hypertens* 18: 595-606, 1996.

Tubau JF and Rahimtoola SH. Hibernating myocardium: a historical perspective. *Cardiovasc Drugs Ther* 6: 267-271, 1992.

van Bilsen M, van der Vusse GJ and Reneman RS. Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflugers Arch* 437: 2-14, 1998.

van Bilsen M, van der Vusse GJ, Gilde AJ, Lindhout M and van der Lee KA. Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding proteins controlling gene expression. *Mol Cell Biochem* 239: 131-138, 2002.

van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC and Reneman RS. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 72: 881-940, 1992.

van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF, Hasselbaink DM and Luiken JJ. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol Cell Biochem* 239: 9-15, 2002.

Vincent G, Comte B, Poirier M and Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846-E856, 2000.

Vincent G, Khairallah M, Bouchard B and Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ^{13}C -substrates and ex vivo perfusion in the working mode. *Mol Cell Biochem* 242: 89-99, 2003.

Voilley N, Roduit R, Vicaretti R, Bonny C, Waeber G, Dyck JR, Lopaschuk GD and Prentki M. Cloning and expression of rat pancreatic beta-cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem J* 340 (Pt 1): 213-217, 1999.

Wang D, Buja LM and McMillin JB. Acetyl coenzyme A carboxylase activity in neonatal rat cardiac myocytes in culture: citrate dependence and effects of hypoxia. *Arch Biochem Biophys* 325: 249-255, 1996.

Wang Y. Signal transduction in cardiac hypertrophy--dissecting compensatory versus pathological pathways utilizing a transgenic approach. *Curr Opin Pharmacol* 1: 134-140, 2001.

Weidemann MJ and Krebs HA. The fuel of respiration of rat kidney cortex. *Biochem J* 112: 149-166, 1969.

Weiss J and Hiltbrand B. Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart. *J Clin Invest* 75: 436-447, 1985.

Weiss RG, Chacko VP and Gerstenblith G. Fatty acid regulation of glucose metabolism in the intact beating rat heart assessed by carbon-13 NMR spectroscopy: the critical role of pyruvate dehydrogenase. *J Mol Cell Cardiol* 21: 469-478, 1989.

Whitmer JT, Idell-Wenger JA, Rovetto MJ and Neely JR. Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts. *J Biol Chem* 253: 4305-4309, 1978.

Wiesner RJ, Ruegg JC and Grieshaber MK. The anaerobic heart: succinate formation and mechanical performance of cat papillary muscle. *Exp Biol* 45: 55-64, 1986.

Wiesner RJ, Rosen P and Grieshaber MK. Pathways of succinate formation and their contribution to improvement of cardiac function in the hypoxic rat heart. *Biochem Med Metab Biol* 40: 19-34, 1988.

Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Gruenke LD, Morris DL and Craig JC. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. *J Clin Invest* 76: 1819-1827, 1985.

Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA and Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ¹⁴C-labeled substrates in humans. *J Clin Invest* 79: 359-366, 1987.

Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA and Gertz EW. Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. *J Clin Invest* 85: 1648-1656, 1990.

Wit-Peeters EM, Scholte HR and Elenbaas HL. Fatty acid synthesis in heart. *Biochim Biophys Acta* 210: 360-370, 1970.

Wolfe RR. *Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine: Principles and practice of kinetic analysis.* New-York: 1992.

Wolff AA, Rotmensch HH, Stanley WC and Ferrari R. Metabolic approaches to the treatment of ischemic heart disease: the clinicians' perspective. *Heart Fail Rev* 7: 187-203, 2002.

Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM and Harris RA. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J* 329 (Pt 1): 197-201, 1998.

Wu P, Inskeep K, Bowker-Kinley MM, Popov KM and Harris RA. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes* 48: 1593-1599, 1999.

Yamada Y, Ishihara T, Fujiwara M, Tamoto S, Seki I and Ohsawa N. Effects of exercise and pacing loads on myocardial amino acid balance in patients with normal and stenotic coronary arteries, with special reference to branched chain amino acids. *Jpn Circ J* 57: 272-282, 1993.

Yano S, Sweetman L, Thorburn DR, Mofidi S and Williams JC. A new case of malonyl coenzyme A decarboxylase deficiency presenting with cardiomyopathy. *Eur J Pediatr* 156: 382-383, 1997.

Young ME, Laws FA, Goodwin GW and Taegtmeyer H. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem* 276: 44390-44395, 2001.

Zakim D. Fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc Soc Exp Biol Med* 212: 5-14, 1996.

Zammit VA. The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem J* 343 Pt 3: 505-515, 1999.

Zarain-Herzberg A and Rupp H. Transcriptional modulators targeted at fuel metabolism of hypertrophied heart. *Am J Cardiol* 83: 31H-37H, 1999.

Zierler K. Whole body glucose metabolism. *Am J Physiol* 276: E409-E426, 1999.

ANNEXE 1**Autres publications scientifiques reliées aux sujets de cette thèse**

1. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B & Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997
2. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B, Jette M, Cordeau S & Des Rosiers C. A ^{13}C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997
3. Poirier M, **Vincent G**, Reszko AE, Bouchard B, Kelleher JK, Brunengraber H & Des Rosiers C. Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol* 283: H1379-H1386, 2002
4. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B, Khairallah M & Des Rosiers C. Modulation of substrate flux through the reversal of the isocitrate dehydrogenase reaction by fatty acids. *Am J Physiol* 283: H1505-H1514, 2002

Probing the Origin of Acetyl-CoA and Oxaloacetate Entering the Citric Acid Cycle from the ^{13}C Labeling of Citrate Released by Perfused Rat Hearts*

(Received for publication, February 13, 1997, and in revised form, August 8, 1997)

Blandine Comte‡, Geneviève Vincent§, Bertrand Bouchard‡, and Christine Des Rosiers‡§¶

From the Departments of ‡Nutrition and §Biochemistry, University of Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

We present a strategy for simultaneous assessment of the relative contributions of anaplerotic pyruvate carboxylation, pyruvate decarboxylation, and fatty acid oxidation to citrate formation in the perfused rat heart. This requires perfusing with a mix of ^{13}C -substrates and determining the ^{13}C labeling pattern of a single metabolite, citrate, by gas chromatography-mass spectrometry. The mass isotopomer distributions of the oxaloacetate and acetyl moieties of citrate allow calculation of the flux ratios: (pyruvate carboxylation)/(pyruvate decarboxylation), (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis), (pyruvate decarboxylation)/(citrate synthesis) (pyruvate carboxylation)/(fatty acid oxidation), and (pyruvate decarboxylation)/(fatty acid oxidation). Calculations, based on precursor-product relationship, are independent of pool size. The utility of our method was demonstrated for hearts perfused under normoxia with [$^{13}\text{C}_3$]lactate + pyruvate and [^{13}C]octanoate under steady-state conditions. Under these conditions, effluent and tissue citrate were similarly enriched in all ^{13}C mass isotopomers. The use of effluent citrate instead of tissue citrate allows probing substrate fluxes through the various reactions non-invasively in the intact heart. The methodology should also be applicable to hearts perfused with other ^{13}C -substrates, such as 1- ^{13}C -labeled long chain fatty acid, and under various conditions, provided that assumptions on which equations are developed are valid.

Tracing of pyruvate metabolism and of other reactions feeding into (anaplerosis) or out (cataplerosis) of the citric acid cycle (CAC)¹ with radioactive or stable isotopes is complicated by label recycling and exchange reactions between CAC intermediates and other metabolites such as aspartate and glutamate. Mathematical models of increasing complexity were developed for the study of the CAC in various organs or tissues (1–12), including the heart (13–17). Solving for flux parameters in equations derived from these models requires measuring the

incorporation of ^{14}C - or ^{13}C -labeled substrate(s) into various CAC metabolites (8, 9) or the distribution of label between carbons of given molecules such as glutamate (1, 13–15, 17–19) or citrate (4, 6). The use of ^{13}C -enriched labeled substrate(s) and measurements of ^{13}C labeling of CAC intermediates or related metabolites by nuclear magnetic resonance (NMR) or gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) offers several advantages over classical ^{14}C methods. Also, these two techniques are complementary. One advantage of GCMS over NMR is its sensitivity. Thus, the ^{13}C labeling of the actual CAC intermediates can be determined.

Investigations on the cardioprotective effects of pyruvate have emphasized the concerted regulation of pyruvate decarboxylation and fatty acid oxidation (14–15, 17, 20–23). For this purpose, elegant ^{13}C NMR techniques were developed to quantify from the ^{13}C labeling of carbons of glutamate, the relative contributions of pyruvate, fatty acid, and ketone body oxidation to acetyl-CoA formation in hearts perfused under various conditions (15, 17, 24–25). By replenishing CAC intermediates, anaplerotic carboxylation of pyruvate could also be a key component for restoration of cardiac function following ischemia (26–28). Substrate fluxes through pyruvate carboxylation were evaluated in hearts perfused with ^{14}C -labeled pyruvate (29–30). However, in these studies, the partitioning of pyruvate between carboxylation and decarboxylation could not be directly quantitated. Such measurements could help clarify the relative importance of these two pathways in the cardioprotective effect of pyruvate (23, 26–27, 29–32).

In the present paper, we present a strategy for the direct and simultaneous assessment of the relative contributions of anaplerotic pyruvate carboxylation, pyruvate decarboxylation, and fatty acid oxidation to citrate formation in the intact perfused rat heart. This is accomplished using a combination of ^{13}C -substrates and requires determination of the ^{13}C mass isotopomer distributions (MIDs) of the acetyl and oxaloacetate (OAA) moieties of a single metabolite, effluent citrate, by GCMS. Part of this work was presented in abstract form (33–35).

THEORY

Principle of Mass Isotopomer Analysis

The relative contributions of pathways feeding OAA and acetyl-CoA for citrate synthesis were determined in hearts perfused with a mix of ^{13}C -substrates under steady-state conditions. [$^{13}\text{C}_3$]Lactate and [$^{13}\text{C}_3$]pyruvate were supplied at physiological concentrations and in a ratio to clamp the redox state. Also a source of acetyl-CoA other than pyruvate, was provided, namely a 1- ^{13}C -labeled fatty acid, octanoate. Calculation of the various substrate flux ratios requires GCMS determination of the MIDs of (i) the acetyl and OAA moieties of citrate and of (ii) pyruvate.

* This work was supported by the Medical Research Council of Canada Grants MA-9575 and MT-10920 (to C. D. R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Laboratory of Intermediary Metabolism, Y-3616, Pavillon Notre-Dame, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke St. East, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Tel.: 514-281-6000 (ext. 7477); Fax: 514-896-4762; E-mail: [redacted]

¹ The abbreviations used are: CAC, citric acid cycle; αKG , α -ketoglutarate; CS, citrate synthase; GCMS, gas chromatography-mass spectrometry; MID, mass isotopomer distribution; MPE, molar percent enrichment; M_i , mass isotopomers with i atoms of ^{13}C ; MF, mol fraction; OAA, oxaloacetate; PC, pyruvate carboxylation; PDC, pyruvate decarboxylation.

Nature of ^{13}C -Citrate Isotopomers Formed

[^{13}C]Octanoate and [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate are metabolized to different citrate mass isotopomers. [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]Lactate, a M3 isotopomer, is converted to [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate which is (i) decarboxylated to [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]acetyl-CoA (M2) by pyruvate decarboxylase and/or (ii) carboxylated to [$1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$]OAA (M3) by pyruvate carboxylase, or to [$1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$]malate (M3) by NADP-linked malic enzyme. Because of the reversibility of the fumarate reaction, [$2,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3$]OAA is also formed. [^{13}C]Octanoate is β -oxidized to [^{13}C]acetyl-CoA (M1). Through the citrate synthase reaction, [^{13}C]acetyl-CoA and [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]acetyl-CoA label citrate on carbon 5 (M1), and on carbons 4 + 5 (M2), respectively. Similarly, [$1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$] or [$2,3,4\text{-}^{13}\text{C}_3$]OAA label citrate on carbons 6 + 3 + 2 and 3 + 2 + 1, respectively. When there is negligible condensation between labeled acetyl-CoA and labeled OAA, citrate thus becomes enriched in M3, M2, and M1 isotopomers. Upon further metabolism in the CAC, these citrate isotopomers form a mixture of M2 and M1 positional isotopomers of OAA. Condensation between M1 and/or M2 acetyl-CoA and M3 OAA forms M4 and M5 citrate isotopomers, which upon further metabolism in the CAC form a mixture of M4, M3, M2, and M1 positional isotopomers of OAA. Theoretically, up to 64 possible citrate isotopomers can be formed, labeled in their acetyl (carbons 4 + 5) and/or OAA (carbons 1 + 2 + 3 + 6) moieties. In hearts perfused with [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]lactate, [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate, and [^{13}C]octanoate, this number is reduced to 48, because there is no formation of citrate isotopomers labeled in their acetyl moiety with only one ^{13}C atom on carbon 4.

Calculation of Relative Substrate Fluxes

The following notations are used in developing the equations: Metabolites: AC, acetyl-CoA; CIT, citrate; OAA, oxaloacetate; OCT, octanoate; PYR_i and PYR_e, intracellular and extracellular pyruvate; AC^{CIT}, the acetyl moiety of citrate, equivalent to carbons 4 and 5 of citrate (C-4 + 5); OAA^{CIT}, the OAA moiety of citrate equivalent to C-1 + 2 + 3 + 6. Isotopomer specifications: OAA_{M_i}, mass isotopomer of a given metabolite, for example OAA, labeled with i atoms of ^{13}C ; MF, mol fraction in a given mass isotopomer (M_i) of a metabolite, calculated as $\text{MF}(M_i) = A_{M_i}/(\sum A_{M_i})$ where A represents the peak area of each fragmentogram, determined by computer integration and corrected for naturally occurring heavy isotopes (6–7, 18, 36); MPE, molar percent enrichment in a given mass isotopomer of a metabolite, equivalent to $\text{MF} \times 100$. Flux rates: FC_{PYR_i→OAA}, fractional contribution (FC) of one metabolite to the total flux of the other, e.g. intracellular pyruvate to OAA. For a given reaction, the sum of the different FCs equals 1.

The principle of the calculation of relative input fluxes from measured MID of given metabolites was described in previous publications for liver and heart perfusions (6–7, 37–38). Briefly, we first assume, for simplicity, that carboxylation of M3 pyruvate is the only pathway forming M3 OAA. Then, we consider the possible formation of M3 OAA through the metabolism in the CAC of some citrate isotopomers.

Conditions Where M3 Pyruvate Is the Sole Source of M3 OAA—The balance of M3 isotopomers of OAA and adjacent metabolites yields Equation 1,

$$(\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{OAA}}) = (\text{OAA}_{\text{M}_3})/(\text{PYR}_{i\text{M}_3}) \quad (\text{Eq. 1})$$

where FC_{PYR_i→OAA} is the fractional contribution of pyruvate to OAA via pyruvate carboxylation, and OAA_{M₃} and PYR_{iM₃} are the MF in M3 of intracellular OAA and pyruvate, respectively. Since for a given reaction, the sum of all FC terms equals 1, then $(1 - \text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{OAA}})$ represents the OAA molecules coming from all other sources, namely from the CAC and from aspar-

tate transamination. Note that FC_{PYR_i→OAA} represents the carboxylation of pyruvate derived from both exogenous and endogenous sources. The fractional contribution of extracellular pyruvate and/or lactate to tissue pyruvate (FC_{PYR_e→PYR_i}) is obtained from Equation 2,

$$(\text{FC}_{\text{PYR}_e \rightarrow \text{PYR}_i}) = (\text{PYR}_{i\text{M}_3})/(\text{PYR}_{e\text{M}_3}) \quad (\text{Eq. 2})$$

where PYR_{eM₃} is the MF in M3 of the incoming pyruvate tracer. The contribution of unlabeled pyruvate arising from glucose or glycogen through glycolysis is $(1 - \text{FC}_{\text{PYR}_e \rightarrow \text{PYR}_i})$.

Since M3 OAA is the only source of M3 citrate labeled in its OAA moiety (OAA^{CIT}), the balance of M3 isotopomers of OAA moiety of citrate and adjacent metabolites yields Equation 3,

$$(\text{FC}_{\text{OAA} \rightarrow \text{CIT}}) = (\text{OAA}_{\text{M}_3}^{\text{CIT}})/(\text{OAA}_{\text{M}_3}) \quad (\text{Eq. 3})$$

where FC_{OAA→CIT} is the fractional contribution of OAA to citrate via citrate synthase, and OAA_{M₃}^{CIT} is the MF in M3 of the OAA moiety of citrate. Multiplying Equation 1 by Equation 3 yields the fractional contribution of pyruvate to citrate via the carboxylation of pyruvate (FC_{PYR_i→CIT(OAA)}). The latter expression is equivalent to the flux ratio (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis), also named factor “y” (2–3, 6, 39–41), when flux through citrate synthase is set equal to 1 (see Equation 4).

$$\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{OAA}(\text{CIT})} = (\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{OAA}}) \times (\text{FC}_{\text{OAA} \rightarrow \text{CIT}}) = \text{OAA}_{\text{M}_3}^{\text{CIT}}/\text{PYR}_{i\text{M}_3} \quad (\text{Eq. 4})$$

Similar reasoning yields the flux ratios (pyruvate decarboxylation)/(citrate synthesis) or factor “x” (2–3, 6, 39) and (octanoate oxidation)/(citrate synthesis) using Equations 5 and 6, respectively,

$$\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})} = (\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{AC}}) \times (\text{FC}_{\text{AC} \rightarrow \text{CIT}}) = \text{AC}_{\text{M}_2}^{\text{CIT}}/\text{PYR}_{i\text{M}_3} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\text{FC}_{\text{OCT} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})} = (\text{FC}_{\text{OCT} \rightarrow \text{AC}}) \times (\text{FC}_{\text{AC} \rightarrow \text{CIT}}) = 4 \times \text{AC}_{\text{M}_1}^{\text{CIT}}/\text{OCT}_{i\text{M}_1} \quad (\text{Eq. 6})$$

where (i) FC_{PYR_i→AC} and FC_{OCT→AC} are the fractional contributions of pyruvate decarboxylation and of octanoate oxidation to acetyl-CoA, respectively; (ii) FC_{AC→CIT} is the fractional contribution of acetyl-CoA to citrate via citrate synthase; and (iii) OCT_{iM₁} is the MF in M1 of intracellular octanoate, which we assumed equal to that of extracellular octanoate, since octanoate is not a physiological fatty acid. The factor 4 in Equation 6 takes into account that octanoate is oxidized to 4 acetyl-CoA; one of which is labeled. The sum of Equations 5 and 6 $(\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{CIT}} + \text{FC}_{\text{OCT} \rightarrow \text{CIT}})$ reflects the relative combined contributions of pyruvate decarboxylation and octanoate oxidation to the acetyl moiety of citrate; the contribution of other substrates (FC_{OAS→AC(CIT)}), such as endogenous fatty acids and/or leucine, is given by Equation 7.

$$\text{FC}_{\text{OAS} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})} = [1 - (\text{FC}_{\text{PYR}_i \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})} + \text{FC}_{\text{OCT} \rightarrow \text{AC}(\text{CIT})})] \quad (\text{Eq. 7})$$

Conditions Where M3 Pyruvate Is Not the Sole Source of M3 OAA—In developing Equations 1–6, we assumed that carboxylation of M3 pyruvate was the only reaction forming M3 OAA molecules. Such assumptions are likely to prevail in hearts perfused with a low enrichment of [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]lactate and [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate. However, in hearts perfused simultaneously with a mix of ^{13}C -substrates, the probability of condensation between labeled acetyl-CoA and labeled OAA is increased. Some citrate molecules labeled in both their acetyl and OAA moieties could be metabolized to M3 OAA in the CAC. Therefore, to assess the validity of our initial assumption, we evaluated the proportion of the M3 OAA molecules formed through the recycling of some citrate isotopomers in the CAC and subsequently corrected the measured MF M3 of the OAA moiety of citrate (OAA_{M₃}^{CIT}). This was done using Equation 8 and requires estimating the (i) MPE of citrate isotopomer precursor of M3 OAA (OAA_{M₃}^{FR}) and (ii) the ^{13}C dilution in the CAC (DF). Values

for (i) MPE OAA_{M3}^{PR} and (ii) DF, obtained using Equations 9 and 10 (see below), are approximations. More precise estimation of these values would require extensive modeling of the metabolism of our mix of ^{13}C -substrates in the CAC,

$$OAA_{M3}^{CIT*} = OAA_{M3}^{CIT} - (OAA_{M3}^{PR} \times DF) \quad (\text{Eq. 8})$$

where (i) OAA_{M3}^{PR} is the enrichment of citrate isotopomer precursor of M3 OAA and (ii) DF is the correction factor for the ^{13}C dilution in the CAC.

The enrichment of citrate isotopomer precursor of M3 OAA was estimated as follows. We identified which of the 48 possible citrate isotopomers are precursors (PR) of M3 OAA (OAA_{M3}^{PR}), assuming steady-state conditions. For example, there are four citrate isotopomers formed from the condensation of M2 acetyl-CoA and M1 OAA molecules: (A) [1,4,5- $^{13}C_3$]citrate; (B) [2,4,5- $^{13}C_3$]citrate; (C) [3,4,5- $^{13}C_3$]citrate; and (D) [4,5,6- $^{13}C_3$]citrate. Upon metabolism in the CAC, citrate isotopomers B and C form M3 OAA, whereas isotopomers A and D form M2 OAA. For simplicity, it is assumed that citrate isotopomers A to D are similarly enriched, although this is an approximation of the actual situation (see "Discussion" for details). Assessing the validity of this assumption requires more extensive modeling of the metabolism of our mix of ^{13}C -substrates in the CAC. Then, the enrichment of citrate isotopomers B and C is estimated from $(AC_{M2}^{CIT} \times OAA_{M1}^{CIT} \times 0.5)$ where AC_{M2}^{CIT} and OAA_{M1}^{CIT} are experimentally determined enrichments of the acetyl and OAA moieties of citrate, and the number 0.5 takes into account that only half of citrate isotopomers formed through the condensation of M2 acetyl-CoA and M1 OAA are metabolized to M3 OAA. This constitutes the first term of Equation 9. Note that for clarity, the superscript CIT was omitted. A similar reasoning was applied for each term of this equation.

$$\begin{aligned} OAA_{M3}^{PR} = & [1/2 \times (AC_{M2} \times OAA_{M1})] + [2/3 \times (AC_{M2} \times OAA_{M2})] \\ & + [1/2 \times (AC_{M2} \times OAA_{M3})] + [1/2 \times (AC_{M1} \times OAA_{M3})] \quad (\text{Eq. 9}) \\ & + [(AC_{M1} \times OAA_{M4})] \end{aligned}$$

The ^{13}C dilution in the CAC due to entry of unlabeled molecules was estimated from the total enrichment in tissue citrate ($CIT_{\Sigma M_i}$) and succinate ($SUC_{\Sigma M_i}$) using Equation 10,

$$DF = [CIT_{\Sigma M_i} - (\Sigma f_i \times OAA_{M1}^{CIT})] / [SUC_{\Sigma M_i}] \quad (\text{Eq. 10})$$

where the factor f takes into account that a fraction of all citrate molecules enriched with one ^{13}C in any one carbon of its OAA moiety are converted to unlabeled succinate. Note that the magnitude of f depends on the nature of the ^{13}C -substrate. For example, f equals 1 for ^{13}C -substrates forming [5- ^{13}C] citrate, such as 1- ^{13}C -labeled fatty acid or acetate. However, f equals 0.5 for ^{13}C -substrates forming [4,5- $^{13}C_2$]citrate, such as [U- $^{13}C_3$]pyruvate or [U- $^{13}C_2$]acetate. With a mix of ^{13}C -substrates, the relative contribution of each substrate to the M1 enrichment of the OAA moiety of citrate needs to be considered.²

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—Chemicals, organic solvents, enzymes, and coenzymes were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Quebec), Fisher

(Montreal, Quebec), Sigma, and Anachemia (Dorval, Quebec). [U- $^{13}C_3$]Lactate, [U- $^{13}C_3$]pyruvate, [1- ^{13}C]octanoate, [U- $^{13}C_2$]acetate, and [U- $^{13}C_3$]glutamate (all 99%) were obtained from Isotec (Miamisburg, OH) and Cambridge Isotope Laboratories (Woburn, MA). The derivatization agent *N*-methyl-*N*-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide was supplied by Regis Chemical (Morton Grove, IL). All aqueous solutions were made with water purified by the "Milli-Q" system (Millipore, St-Laurent, Quebec).

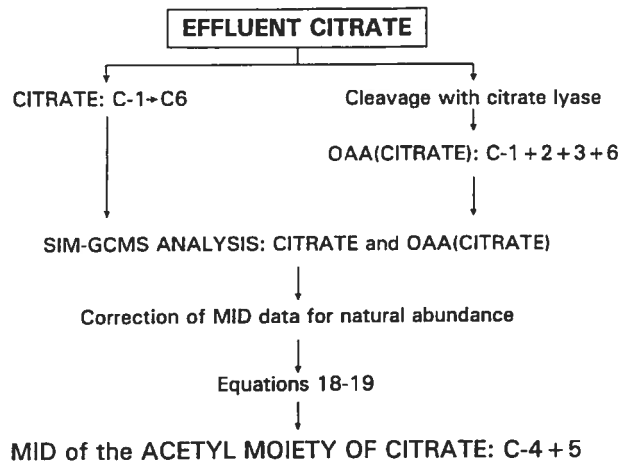
Heart Perfusions—Fed male Sprague-Dawley rats (Charles River, Quebec) weighing 120–220 g were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (65 mg/kg). After opening the chest and insertion of a cannula into the aorta, hearts were excised and transferred to a Langendorff set up as described previously (38, 42). Briefly, hearts (wet weight 1.1–1.3 g) were perfused for up to 60 min retrogradely through the aorta at a constant pressure of 80 mmHg with a non-recirculating Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 1.3 mM calcium, 11 mM glucose, 1 or 0.5 mM lactate, 0.2 or 0.05 mM pyruvate, 0.2 mM octanoate, with or without 0.5 mM glutamate or 0.1 mM acetate. The buffer was gassed with 95% O_2 :5% CO_2 (pH 7.4) at 38 °C. The following parameters were continuously monitored through instruments linked to a microcomputer: (i) coronary flow, using an electromagnetic flow probe (model FM501, Carolina Medical Electronics, King, NC) installed above the aortic cannula; (ii) temperature using a thermocouple (Yellow Springs Instrument, Yellow Springs, OH) attached to the surface of the heart; and (iii) contractile function using a latex balloon filled with fluid inserted into the left ventricular cavity and connected to a pressure transducer (Digi-Med Heart Performance Analyzer, Micro-Med, Louisville, KY). Hearts that did not show an increase in coronary flow on release of a 20–25-s period of in-flow occlusion were discarded. Under our conditions, hearts were beating spontaneously at 280 ± 19 beats/min and maintained a contractile function (dP/dT) of 2099 ± 152 mmHg/s and a coronary flow rate of 9.3 ± 0.6 ml/min.

After a 15–20-min equilibration period, one or more unlabeled substrate(s) were replaced by the corresponding labeled substrates either (i) [1- ^{13}C]octanoate, (ii) [U- $^{13}C_3$]lactate + [U- $^{13}C_3$]pyruvate, (iii) [1- ^{13}C]octanoate + [U- $^{13}C_3$]lactate + [U- $^{13}C_3$]pyruvate, (iv) [U- $^{13}C_3$]glutamate, or (v) [U- $^{13}C_2$]acetate. Starting 10 min before the labeling period, samples of effluent perfusate (20 ml) were collected every 5 min and processed as follows: (i) 7 ml was immediately made 10 mM hydroxylamine-hydrochloride and sonicated for 1 min to convert α -ketoglutarate (α KG) to its oxime derivative (43); (ii) 10 ml was made 1% sulfosalicylic acid; and (iii) 1 ml was left untreated. Samples were stored at -20 °C until analysis. After perfusing for 40 min with ^{13}C -substrate(s), hearts were freeze-clamped and stored in liquid nitrogen.

GCMS Methodology—The MID of tissue and effluent perfusate citrate and other CAC metabolites (α KG, OAA, succinate, fumarate, malate) was determined by published GCMS methods (6, 18, 37–38, 43). For subcellular fractionation, tissue was homogenized in Tris buffer 50 mM with sucrose 250 mM (pH 7.4) (15% w/v), followed by sequential 10 min centrifugation at 4 °C, at 1,000 $\times g$, and at 10,000 $\times g$ (44). Supernatant and pellet were extracted with ethyl acetate and analyzed for citrate. For determination of the MID of the OAA moiety of effluent citrate, effluent perfusate samples treated with sulfosalicylic acid were adjusted to pH 7.6 and reacted with an excess of $NaBH_4$ (10 μ mol) to convert OAA to malate. After 30 min at room temperature, the solution was acidified with concentrated HCl to destroy residual $NaBH_4$, and the pH was readjusted to 7.6 before the addition of 750 μ l of 500 mM triethanolamine buffer (pH 7.4) containing 100 mM $MgSO_4$, 50 mM EDTA, 50 μ mol hydroxylamine-hydrochloride, and 2.5 units of citrate lyase. After 5 min at 37 °C, samples were sonicated (for complete conversion of OAA to its oxime derivative (43)). After addition of 350 μ l of saturated sulfosalicylic acid and centrifugation at 3,000 $\times g$ for 15 min, the oxime was extracted from the supernatant with 3 \times 18 ml of diethyl ether. From the measured MIDs of effluent citrate and of its OAA moiety, we calculated the MIDs of the acetyl moiety of effluent citrate (see below for details).

GCMS Conditions—All metabolites were analyzed as their *t*-butyldimethylsilyl derivatives on a Hewlett-Packard 5890 Series I or II gas chromatograph coupled to a 5988A mass spectrometer or 5972A mass selective detector. Both instruments were equipped with a HP 5 capillary column (30 or 50 m, 0.2-mm inner diameter, 0.33- μ m film thickness). The mass spectrometer was operated in the electron impact mode (70 eV) after automatic and manual calibrations (to optimize sensitivity in the high mass range). Split ratio injection was about 10/1, carrier gas helium was at 0.6–0.8 ml/min, and column head pressure at 138 kPa (30-m column) and 207 kPa (50-m column). Appropriate ion sets were monitored with a dwell time of 45–75 ms per ion. The GC

² Under our perfusion conditions, the percentage contributions of [1- ^{13}C]octanoate and [U- $^{13}C_3$]lactate + pyruvate to M1 OAA enrichment are evaluated to be 78.9 ± 0.6 and $21.2 \pm 0.4\%$, respectively, from experiments where hearts were perfused with a single ^{13}C -substrate (MPE M1 OAA (citrate); Table II; Conditions A and B). Therefore, Σf_i equals $(0.79 \times 1) + (0.21 \times 0.5)$ or 0.895. Alternatively, the relative contributions of these ^{13}C -substrates can be estimated from the M1 and M2 enrichments of the acetyl moiety of citrate, 88.0 ± 0.3 and $12.0 \pm 0.7\%$, respectively (Table IIIC).



SCHEME 1. Determination of the MID of the acetyl moiety of citrate. This scheme summarizes the experimental procedure followed to determine the M1 and M2 enrichments of the acetyl moiety of citrate from the measured MID of effluent citrate and of its OAA moiety, obtained after cleavage with citrate lyase.

temperature programs, elution times, and ions monitored for the analysis of the MID of CAC metabolites were previously reported (6, 18, 37–38, 43). Areas under each fragmentogram were determined by computer integration and corrected for naturally occurring heavy isotopes (6–7, 18, 36).

MID of the Acetyl Moiety (C-4 + 5) of Citrate—The MID of the acetyl moiety of citrate ($AC_{M_i}^{CIT}$) was calculated from the measured MIDs of effluent citrate (CIT_{M_i}) and of its OAA moiety ($OAA_{M_i}^{CIT}$), obtained after cleavage with citrate lyase (see Scheme 1). The enrichment of each mass isotopomer of citrate is a function of those of its acetyl and OAA moieties (Equations 11–17). Note that for clarity, the superscript CIT was omitted from the factors “AC” and “OAA” in Equations 11–17.

$$CIT_{M_0} = AC_{M_0} \times OAA_{M_0} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$CIT_{M_1} = (AC_{M_0} \times OAA_{M_1}) + (AC_{M_1} \times OAA_{M_0}) \quad (\text{Eq. 12})$$

$$CIT_{M_2} = (AC_{M_0} \times OAA_{M_2}) + (AC_{M_1} \times OAA_{M_1}) + (AC_{M_2} \times OAA_{M_0}) \quad (\text{Eq. 13})$$

$$CIT_{M_3} = (AC_{M_0} \times OAA_{M_3}) + (AC_{M_1} \times OAA_{M_2}) + (AC_{M_2} \times OAA_{M_1}) \quad (\text{Eq. 14})$$

$$CIT_{M_4} = (AC_{M_0} \times OAA_{M_4}) + (AC_{M_1} \times OAA_{M_3}) + (AC_{M_2} \times OAA_{M_2}) \quad (\text{Eq. 15})$$

$$CIT_{M_5} = (AC_{M_1} \times OAA_{M_4}) + (AC_{M_2} \times OAA_{M_3}) \quad (\text{Eq. 16})$$

$$CIT_{M_6} = (AC_{M_2} \times OAA_{M_4}) \quad (\text{Eq. 17})$$

In Equations 11–17, the MID data are expressed as MF. Note that the sum of the MF of all mass isotopomers of a given substrate equals 1.

These equations were solved for the M1 and M2 enrichments of the acetyl moiety of citrate (i) using a spreadsheet program (Lotus, release 3.1) and (ii) by simplification. First, using our program, MIDs of citrate were calculated from measured MIDs of its OAA moiety and different theoretical MID values of its acetyl moiety. Solutions for the M1 and M2 enrichments of the acetyl moiety of citrate were considered optimal when the difference between calculated and measured MIDs of citrate was 10% or less. Second, for simplification of Equations 11–17, only Equations 11–14 were considered since under our conditions citrate enrichments in M4, M5, and M6 isotopomers were less than 1.5%. This yielded Equations 18–20.

$$AC_{M_1}/AC_{M_0} = CIT_{M_1}/CIT_{M_0} - OAA_{M_1}/OAA_{M_0} \quad (\text{Eq. 18})$$

$$AC_{M_2}/AC_{M_0} = [CIT_{M_2}/CIT_{M_0} - OAA_{M_2}/OAA_{M_0}] - [AC_{M_1}/AC_{M_0} \times OAA_{M_1}/OAA_{M_0}] \quad (\text{Eq. 19})$$

$$AC_{M_2}/AC_{M_0} = [(CIT_{M_2}/CIT_{M_0} - OAA_{M_2}/OAA_{M_0}) - (AC_{M_1}/AC_{M_0} \times OAA_{M_2}/OAA_{M_0})]/(OAA_{M_1}/OAA_{M_0}) \quad (\text{Eq. 20})$$

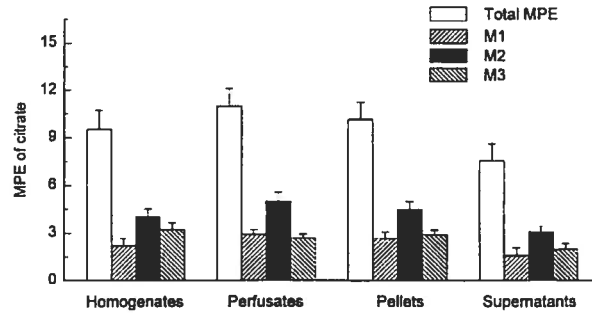


FIG. 1. MIDs of tissue and effluent citrate labeled from $[U-^{13}C_3]$ lactate + $[U-^{13}C_3]$ pyruvate. Rat hearts were perfused under normoxia with non-recirculating buffer containing 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate. After a 15–20-min equilibration period, unlabeled lactate and pyruvate were replaced by $[U-^{13}C_3]$ lactate and $[U-^{13}C_3]$ pyruvate and the experiment continued for 40 min before freeze-clamping of the heart. Subcellular fractionation of the heart was performed as described under “Experimental Procedures.” The MIDs of citrate from (i) effluent perfusate collected immediately prior to freeze-clamping of the heart, (ii) whole tissue homogenates, (iii) tissue fractions enriched in mitochondria, and (iv) tissue fractions enriched in cytosol were corrected for natural abundance of heavy isotopes (6, 43) and are expressed as molar percent enrichment (MPE). Data are means \pm S.E. of four heart perfusions. MID of tissue versus effluent citrate: NS, using an analysis of variance for repeated measures.

The M1 enrichment of the acetyl moiety of citrate was obtained from Equation 18. It was then used to solve for the M2 enrichment of the acetyl moiety of citrate using Equations 19 or 20. Under our conditions, values of M2 calculated with Equation 19 showed less variability than with Equation 20. This is illustrated by the data of triplicate injections of a sample of effluent citrate and of its OAA moiety. The coefficient of variation ($CV = S.D./mean \times 100$) of M2 enrichments was less than 7% using Equation 19 and up to 75% using Equation 20. For comparison, the CV for M1 enrichments of the acetyl moiety of citrate was less than 2%. Also, M2 enrichments of the acetyl moiety of citrate, calculated using Equation 19, correlated significantly with those obtained with our spreadsheet program ($r = 0.96$, compared with $r = -0.48$ with Equation 20). Therefore, we concluded that Equations 18 and 19 provide a simple and reliable mean to calculate the M1 and M2 enrichments of the acetyl moiety of citrate from the measured MIDs of citrate and of its OAA moiety. In the present paper, we report only values calculated using these equations.

Expression of Results and Statistical Analysis—The MIDs of the various metabolites, corrected for natural abundance, are expressed as molar percent enrichment (MPE). For calculations of the MID of acetyl-CoA and of relative flux parameters (FC values), MID data are expressed as mol fraction (MF). Data are presented as means \pm S.E. Statistical significance at $p < 0.05$ was assessed using the indicated test.

RESULTS AND DISCUSSION

Origin of Effluent Citrate—Rat hearts perfused with ^{13}C -substrates under normoxic conditions constantly released small amounts of ^{13}C -labeled citrate, the MID of which can be analyzed with precision by GCMS. The average coefficient of variations ($\% CV = S.D./mean \times 100$) for all measured enrichments was $6 \pm 1\%$. To identify the origin of this effluent citrate, the ^{13}C labeling of citrate isolated from the effluent perfusate collected after 35–40 min of heart perfusion with $[U-^{13}C_3]$ lactate and $[U-^{13}C_3]$ pyruvate was compared with that of citrate isolated from different centrifugal preparations of heart homogenates enriched in either mitochondria or cytosol. As shown in Fig. 1, citrate isolated from all sources was similarly enriched in all mass isotopomers, indicating a similar origin. Citrate could be formed (i) from OAA and acetyl-CoA via citrate synthase and/or (ii) from α KG and bicarbonate through the reversal of the aconitase and isocitrate dehydrogenase reactions. To determine the relative contributions of these pathways, hearts were perfused with unlabeled lactate, pyruvate,

TABLE I
 ^{13}C enrichment of tissue CAC intermediates
 labeled from $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{glutamate}$

Rat hearts were perfused for 40 min under normoxia with non-recirculating buffer containing 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.2 mM octanoate, and 0.5 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{glutamate}$. The MID of metabolites, isolated from freeze-clamped hearts, was corrected for natural abundance of heavy isotopes (6, 43). Data are expressed as molar percent enrichment (MPE) and are means \pm S.E. ($n = 5$). For all metabolites, the MPE in M1 to M3 isotopomers was below 0.5% (not shown).

| Tissue metabolites | Molar percent enrichment | |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| | M4 | M5 |
| Citrate | 0.25 \pm 0.01 | 0.18 \pm 0.01 |
| α -Ketoglutarate | 0.49 \pm 0.07 | 3.68 \pm 0.49 |
| Succinate | 1.56 \pm 0.12 | |
| Fumarate | 0.60 \pm 0.11 | |
| Malate | 0.56 \pm 0.04 | |

octanoate, and 0.5 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{glutamate}$ following a protocol developed for perfused livers (37). From the measured M5 enrichment of tissue citrate and αKG , shown in Table I, one calculates the fractional contribution of αKG to citrate through the reversal of the aconitase and isocitrate dehydrogenase reactions ($\text{FC}_{\alpha\text{KG}\rightarrow\text{CIT}}$) to be $5.0 \pm 1.0\%$. The remaining 95% of citrate molecules comes from OAA. This low rate of reversal of the aconitase and isocitrate dehydrogenase reactions in the heart contrasts with that in perfused livers where as much as 45% of all citrate molecules was formed from αKG (37).

From the above data, we concluded that hearts perfused under normoxia with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, and/or $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$ released a small amount of ^{13}C -labeled citrate, the MID of which reflected that of tissue citrate formed predominantly through citrate synthase. Citrate efflux, which was shown to increase with citrate concentration in isolated rat heart mitochondria (45), may be favored by the inclusion in our perfusion buffer of several citrate precursors (glucose, lactate, pyruvate, octanoate, see "Discussion" in Comte *et al.* (61)). The rate of citrate efflux (~ 10 – 50 nmol/min) is compatible with the reported low activity of the mitochondrial tricarboxylate transporter of rat heart (45–46).

^{13}C Labeling of the Acetyl and OAA Moieties of Citrate—The ^{13}C labeling of the acetyl and OAA moieties of effluent citrate was examined in hearts perfused with 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate with or without 0.1 mM acetate. In any one perfusion, one or more unlabeled substrate was replaced by the corresponding ^{13}C -substrate(s), $[\text{U-}^{13}\text{C}_3](\text{lactate} + \text{pyruvate})$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$, and/or $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetate}$. These ^{13}C -substrates are metabolized to different citrate isotopomers. For details on the metabolism of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3](\text{lactate} + \text{pyruvate})$ and $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$, please see "Experimental Procedures." As for $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetate}$, it is activated to $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetyl-CoA}$ by the mitochondrial acetyl-CoA synthetase. Then, similar to the decarboxylation of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{citrate}$ is formed.

Following the addition of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, and $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$, there was a time-dependent increase in the MPEs of M1, M2, and M3 isotopomers of effluent citrate (Fig. 2). Near isotopic steady state was attained more rapidly for M3 and M2 (10–15 min) than for M1 (20–30 min) isotopomers. Table II compares the MIDs of effluent citrate and of its OAA moiety when hearts were perfused for more than 30 min with one or more ^{13}C -substrates. These MID data were then introduced into Equations 18 and 19 to calculate the MID of the acetyl moiety of citrate, shown in Table III. Note that a good precision was obtained for these calculated values when measured ^{13}C enrichments were above 5%. For example, the mean M2 enrichment of the acetyl moiety of citrate (\pm S.D.) and CV (%) for 3–5 injections

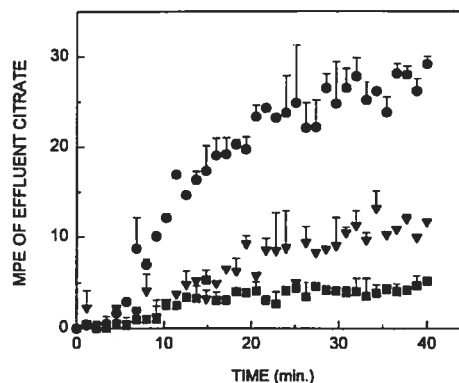


FIG. 2. Time-dependent increase in the MPE of M1 (●), M2 (▼), and M3 (■) isotopomers of effluent citrate. A rat heart was perfused under normoxia with non-recirculating buffer containing 11 mM glucose, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate. After a 20-min equilibration period, unlabeled lactate, pyruvate, and octanoate were replaced by $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, and $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$. Citrate was extracted from the effluent perfusate collected at various times and analyzed by GCMS. Data are corrected for natural abundance of heavy isotopes (6, 43) and expressed as molar percent enrichment (MPE). They are means \pm S.E. ($n > 2$) or S.D. ($n = 2$) of two to four different GCMS injections.

was 9.1 ± 0.5 and 5%, respectively, for an effluent sample collected from hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetate}$ but was $0.75 \pm 0.31\%$ and 42%, respectively, for a sample collected from hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3](\text{lactate} + \text{pyruvate})$.

Despite variations, the labeling patterns observed in Tables II and III are compatible with the known metabolism of the ^{13}C -substrates. This is apparent for hearts perfused with one ^{13}C -substrate, either $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$ and $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$, or $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetate}$ (Tables II and III, A, B, and D), but not with a mix of ^{13}C -substrates (Tables IIC and IIIC). For example, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$ is oxidized to $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{acetyl-CoA}$ which is converted to $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{citrate}$. Upon further metabolism, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{citrate}$ is converted to $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{OAA}$ labeled on any one carbon. Accordingly, when hearts were perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$ as sole tracer, citrate as well as its acetyl and OAA moieties, were predominantly enriched in M1 isotopomers (Table IIA, 1st and 2nd lines, and Table IIIA). The small enrichment in M2 citrate (Table IIA, 1st line) results mostly from the condensation of M1 OAA with M1 acetyl-CoA. However, the presence of some M2 (<1%) in the acetyl moiety of citrate (Table IIIA) cannot be explained by known pathways of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{octanoate}$ metabolism. Therefore, the M2 was ascribed to background noise and was subtracted from the M2 enrichment of the acetyl moiety of citrate calculated for heart perfusions with all three ^{13}C -substrates (see below for further discussion on the precision of the calculated MPE of the acetyl moiety of citrate).

With $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$ and $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$ (Tables IIB and IIIB), citrate became enriched in all three ^{13}C mass isotopomers predominantly through the incorporation of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{OAA}$. This is indicated by the similar MIDs of citrate and of its OAA moiety (Table IIB, compare lines 1 and 2). Accordingly, the acetyl moiety of citrate was only very slightly enriched in M2 but not in M1 (Table IIIB). The M2 enrichment probably results from a very low rate of decarboxylation of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$ to $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetyl-CoA}$ followed by conversion to $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{citrate}$, confirming the inhibition of pyruvate dehydrogenase in hearts perfused with fatty acids (47–49). In contrast, in hearts perfused with $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]\text{acetate}$, citrate showed a higher enrichment than its OAA moiety (Table II) reflecting incorporation of $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ through its acetyl moiety (Table IIID).

Calculation of Relative Fluxes—The MIDs of the acetyl and

TABLE II
¹³C labeling of effluent citrate and of its OAA moiety isolated from hearts perfused with one or more ¹³C-substrate(s)

Hearts were perfused under normoxia with non-recirculating buffer containing 11 mM glucose and 0.2 mM octanoate. Other additions were lactate and pyruvate at 0.5 and 0.05 mM (A and D) or 1 and 0.2 mM (B and C), respectively, and acetate at 0.1 mM (A and D). After 15–20 min equilibration, one or more unlabeled substrate(s) were replaced by the corresponding labeled substrate(s), as indicated. The perfusion was continued for another 40 min. MID data, corrected for natural abundance in heavy isotopes, are shown as MPE and are means ± S.E. for *n* different perfusions. ND, not determined.

| | ¹³ C-substrate added/metabolite analyzed | Molar percent enrichment | | | | |
|----|--|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | M1 | M2 | M3 | M4 | Total |
| A. | [1- ¹³ C]Octanoate (<i>n</i> = 4) | | | | | |
| | Citrate | 31.4 ± 0.2 | 4.25 ± 0.09 | 0.83 ± 0.09 | N.D. | 36.3 ± 0.5 |
| B. | [U- ¹³ C ₃](Lactate + pyruvate) (<i>n</i> = 7) | | | | | |
| | Citrate (OAA moiety) | 15.7 ± 0.8 | 0.12 ± 0.12 | 0.18 ± 0.08 | N.D. | 16.2 ± 0.7 |
| C. | [1- ¹³ C]Octanoate + [U- ¹³ C ₃](lactate + pyruvate) (<i>n</i> = 8) | | | | | |
| | Citrate | 3.70 ± 0.31 | 3.39 ± 0.30 | 2.57 ± 0.26 | 0.13 ± 0.04 | 9.80 ± 0.66 |
| D. | [U- ¹³ C ₂]Acetate (<i>n</i> = 4) | | | | | |
| | Citrate (OAA moiety) | 3.68 ± 0.32 | 3.07 ± 0.30 | 2.58 ± 0.27 | 0.09 ± 0.02 | 9.37 ± 0.87 |
| A. | [1- ¹³ C]Octanoate + [U- ¹³ C ₃](lactate + pyruvate) (<i>n</i> = 8) | | | | | |
| | Citrate | 29.5 ± 0.5 | 10.2 ± 0.72 | 4.97 ± 0.38 | 1.52 ± 0.22 | 46.5 ± 1.3 |
| B. | [U- ¹³ C ₃]Acetate (<i>n</i> = 4) | | | | | |
| | Citrate (OAA moiety) | 18.1 ± 0.8 | 4.72 ± 0.35 | 5.54 ± 0.80 | 0.40 ± 0.12 | 28.8 ± 1.7 |
| C. | [U- ¹³ C ₂]Acetate (<i>n</i> = 4) | | | | | |
| | Citrate | 9.84 ± 0.31 | 12.5 ± 0.14 | 1.77 ± 0.55 | N.D. | 21.8 ± 1.5 |
| D. | [U- ¹³ C ₂]Acetate (<i>n</i> = 4) | | | | | |
| | Citrate (OAA moiety) | 8.47 ± 1.10 | 5.72 ± 0.06 | 0.31 ± 0.01 | N.D. | 14.6 ± 0.8 |

TABLE III
¹³C labeling of the acetyl moiety of citrate released by hearts perfused with one or more ¹³C-substrate(s)

Other data from perfusion experiments described in Table II. The enrichments in M1 and M2 of the acetyl moiety of effluent citrate were calculated from measured MIDs of effluent citrate and of its OAA moiety using Equations 18 and 19. Data are expressed as MPE and are means ± S.E. for *n* different perfusions.

| ¹³ C-Substrate added | Molar percent enrichment | |
|---|--------------------------|-------------|
| | M1 | M2 |
| A. (1- ¹³ C)Octanoate (<i>n</i> = 4) | 23.0 ± 0.5 | 0.67 ± 0.19 |
| B. [U- ¹³ C ₃](Lactate + pyruvate) (<i>n</i> = 7) | 0.58 ± 0.65 ^a | 0.62 ± 0.20 |
| C. [1- ¹³ C]Octanoate + [U- ¹³ C ₃](lactate + pyruvate) (<i>n</i> = 8) | 22.0 ± 0.4 | 2.99 ± 0.85 |
| D. [U- ¹³ C ₂]Acetate (<i>n</i> = 4) | 1.21 ± 0.72 ^a | 7.97 ± 0.58 |

^a Nonsignificant mean tested against the null hypothesis.

OAA moieties of effluent citrate of hearts perfused with [U-¹³C₃]lactate, [U-¹³C₃]pyruvate, and [1-¹³C]octanoate (shown in Tables IIC and IIIC) were introduced into Equations 4–6 to calculate the following flux ratios: (i) (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis) (PC/CS, Equation 4); (ii) (pyruvate carboxylation)/(octanoate oxidation) (PC/OCT; Equation 4/Equation 6); (iii) (octanoate oxidation)/(citrate synthesis) (OCT/CS, Equation 6); (iv) (pyruvate decarboxylation)/(citrate synthesis) (PDC/CS, Equation 5); (v) (pyruvate decarboxylation)/(octanoate oxidation) (PDC/OCT, Equation 5/Equation 6); and finally (vi) (pyruvate carboxylation)/(pyruvate decarboxylation) (PC/PDC, Equation 4/Equation 5). Calculation of all flux ratios, except iii and vi, required the M3 enrichment of tissue pyruvate. The latter was 72.1 ± 1.5% (*n* = 3), indicating that tissue pyruvate arose predominantly from exogenous pyruvate and/or lactate (from Equation 2). Tissue pyruvate enrichment in M1 and M2 isotopomers was negligible (not significant; mean tested against the null hypothesis), suggesting low pyruvate recycling through pyruvate → OAA → malate → pyruvate, or pyruvate → acetyl-CoA → CAC → malate → pyruvate. However, because of evidence supporting compartmentation of myocardial pyruvate (30, 50–51), one cannot exclude recycling of a very small mitochondrial pool of pyruvate which would not be detected by GCMS assay of pyruvate in whole heart homogenates.

From our data, we calculated that in hearts perfused with 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate, the flux ratio (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis) (PC/CS) equals 0.077 ± 0.011 (*n* = 8). The acetyl-CoA moiety of citrate was supplied almost exclusively by octanoate oxidation (OCT/

CS = 0.88 ± 0.02). The contribution of pyruvate decarboxylation to acetyl-CoA formation was low (PDC/CS = 0.041 ± 0.012) and that of other substrates such as endogenous fatty acids and/or leucine amounted to 0.078 ± 0.018 (Equation 7). The flux ratios PC/CS, OCT/CS, and PC/OCT agree with other reports for similarly perfused hearts (13–15, 24–25, 52).

Methodological Considerations: Advantages and Limitations—In this paper, we show how one can use the ¹³C labeling pattern of citrate released by hearts perfused with ¹³C-substrates to probe the origin of the acetyl-CoA and OAA moieties of citrate. This reflects the relative contributions of pyruvate carboxylation, pyruvate decarboxylation, and fatty acid oxidation. One could also analyze tissue citrate after purification through ion-exchange chromatography (53). However, the use of effluent instead of tissue citrate allows probing substrate fluxes non-invasively through the various reactions in hearts perfused under different conditions. For our perfusion experiments, we chose ¹³C-substrates and concentrations to allow competition at the acetyl-CoA and OAA branch point of pyruvate metabolism. Also, anaplerotic pyruvate carboxylation was favored by the inclusion of (i) physiological concentrations of lactate and pyruvate and of (ii) a medium chain fatty acid (26). In hearts, unlike long chain fatty acids, medium chain fatty acids are not esterified but completely oxidized in mitochondria (54). For future studies, one may consider replacing octanoate with another more physiological fatty acid. By measuring the M3 enrichment of tissue pyruvate, we evaluated the carboxylation and decarboxylation of pyruvate from all sources, exogenous and endogenous. Alternatively, one could assay the M3 enrichment of tissue alanine, the labeling of which reflects that of pyruvate molecules committed to the CAC in hearts perfused with [3-¹³C]pyruvate (55). Whether the MID of effluent alanine also reflects that of tissue pyruvate remains to be examined. Note that the contribution of intracellular pyruvate to the acetyl moiety of citrate does not reflect its contribution to the total acetyl-CoA pool; part of the acetyl-CoA could be converted to acetylcarnitine and channeled to the cytosol (56–57).

The reliability of the various flux ratios calculated from our MID data depends (i) on the precision of the measured and calculated enrichment data and (ii) on the validity of assumptions on which Equations 1–6 were developed. Low precision on calculated enrichment values of the acetyl moiety of citrate below 5% results in part from the high natural background of the M1 and M2 ions for the *t*-butyldimethylsilyl of citrate and OAA (for *e.g.* M2/M0 = 0.183 and 0.163, respectively). Precision is further decreased when these low enrichments occur at a

mass adjacent to one which is highly enriched (see Ref. 36 for detail). This probably explain why the M2 enrichment of the acetyl moiety of citrate (i) was significantly different from zero in hearts perfused with [1-¹³C]octanoate alone (Table IIIA), and (ii) was slightly, but significantly ($p < 0.05$; unpaired t test), greater for hearts perfused with both [1-¹³C]octanoate and [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) (Table IIIC) than with [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) alone (Table IIIB). To decrease this variability, two strategies could be considered. First, one could calculate the enrichments of the acetyl moiety of citrate by (i) introducing into Equations 11–17 the uncorrected MID data of citrate and of its OAA moiety, and (ii) including their natural abundance in a fitting routine (58). This one-step calculation requires an overdetermined system, *i.e.* that the number of citrate isotopomers measured exceeds the number of isotopomers of its acetyl moiety to be calculated. This should be advantageous because it compensates for errors or variations in the correction factors for natural abundance of all measured isotopomers. Alternatively, one could assay directly the MID of the acetyl moiety of citrate after cleavage with ATP-citrate lyase and conversion of acetyl-CoA to acetylglycine (59). The latter has a low natural abundance background at the M1 and M2 ions ($M1/M0 = 0.0504$; $M2/M0 = 0.00715$). The second approach requires, however, purification of ATP-citrate lyase from liver. Direct analysis of the ¹³C labeling of the acetyl moiety of citrate either as (i) acetate released by cleavage of citrate with citrate lyase or (ii) as acetyl-CoA released by cleavage of citrate with ATP-citrate lyase, as described previously (53), was not feasible because of contamination with unlabeled acetate or a too low concentration of citrate in the effluent perfusate ($\sim 1 \mu\text{M}$), respectively (not shown).

As for the assumptions of Equations 1–6, they are as follows: (i) the ¹³C labeling of effluent citrate reflects that of tissue citrate; (ii) citrate is formed only through the citrate synthase reaction; (iii) the M1 enrichment of the acetyl moiety of citrate results exclusively from the oxidation of fatty acid, in the present study, [1-¹³C]octanoate, and (iv) the carboxylation of [U-¹³C₃]pyruvate is the only reaction generating M3 OAA. Under our conditions, the first three assumptions were valid. First, there were no significant differences in the measured MIDs of effluent and tissue citrate (Fig. 1). Second, the rate of citrate formation by the reversal of the aconitase and isocitrate dehydrogenase reactions was low (Table I). Third, perfusing hearts with [1-¹³C]octanoate, but not with [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) or [U-¹³C₂]acetate, resulted in significant M1 enrichment of the acetyl moiety of effluent citrate (Table IIIA and B). Note that the second and third assumptions might not be valid in other perfusion conditions or other organs or cell systems such as liver (6–7, 37) or β -cells (60) where there is substantial pyruvate recycling through the reactions: pyruvate \rightarrow OAA \rightarrow malate \rightarrow pyruvate, or pyruvate \rightarrow OAA \rightarrow phosphoenolpyruvate \rightarrow pyruvate. With respect to the fourth assumption, its validity was evaluated using Equations 8–10. Under our conditions, the MF of citrate isotopomers, precursors of M3 OAA ($\text{OAA}_{M3}^{\text{PR}}$), was 0.0116 (Equation 9).³ The dilution factor was 1.13 ± 0.04 ($n = 8$, Equation 10), which is similar to that

reported for the perfused rat heart (12). Thus, more than 82% of M3 OAA molecules was formed through carboxylation of [U-¹³C₃]pyruvate. Accordingly, correcting the measured M3 enrichment of the OAA moiety of citrate for the contribution of citrate isotopomers (Equation 8) did not significantly modify the flux ratios (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis) (0.063 ± 0.009 versus 0.077 ± 0.011 ; paired t test). The formation of M3 OAA, from citrate isotopomers recycling through the CAC, should be minimized by lowering the enrichment of the incoming ¹³C-substrates. Under our conditions, however, [U-¹³C₃]pyruvate and [U-¹³C₃]lactate ought to be supplied at a high enrichment to label significantly the acetyl and OAA moiety of citrate; the enrichment of [1-¹³C]octanoate could be lowered to 25 or 50%.

In conclusion, we developed a strategy to assess directly and simultaneously the relative contributions of pyruvate carboxylation, pyruvate decarboxylation, and fatty acid oxidation to citrate formation in perfused rat heart. This requires perfusing hearts with a mix of ¹³C-substrates and determining the ¹³C labeling pattern of citrate. The use of effluent citrate instead of tissue citrate allows probing substrate fluxes non-invasively through the various reactions in hearts perfused under various conditions. The utility of this method was demonstrated for hearts perfused under normoxia with [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) and [1-¹³C]octanoate. The methodology should also be applicable to hearts perfused with other ¹³C-substrates, such as [1-¹³C]labeled long chain fatty acid, and under various conditions, provided that assumptions on which equations are developed are valid.

REFERENCES

- Magnusson, I., Schumann, W. C., Bartsch, G. E., Chandramouli, V., Kumaran, K., Wahren, J., and Landau, B. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6975–6984
- Lee, W.-N. P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13002–13004
- Lee, W.-N. P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25522–25526
- Kelleher, J. K. (1985) *Am. J. Physiol.* **248**, E252–E260
- Kelleher, J. K. (1986) *Am. J. Physiol.* **250**, E296–E305
- Des Rosiers, C., Di Donato, L., Comte, B., Laplante, A., Marcoux, C., David, F., Fernandez, C. A., and Brunengraber, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10027–10036
- Fernandez, C. A., and Des Rosiers, C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10037–10042
- Baranyai, J., and Blum, J. J. (1989) *Biochem. J.* **258**, 121–140
- Heath, D. F., and Rose, J. G. (1985) *Biochem. J.* **227**, 851–867
- Müllhofer, G., Müller, C., Von Stetten, C., and Gruber, E. (1977) *Eur. J. Biochem.* **75**, 331–341
- Martin, G., Chauvin, M.-F., Dugelay, S., and Baverel, G. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26034–26039
- Rognstad, R. (1993) *Biochem. Arch.* **9**, 15–25
- Weiss, R. G., Gloth, S. T., Kalil-Filho, R., Chacko, V. P., Stern, M. D., and Gerstenblith, G. (1992) *Circ. Res.* **70**, 392–408
- Chance, E. M., Seeholzer, S. H., Kobayashi, K., and Williamson, J. R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13785–13794
- Chatham, J. C., Forder, J. R., Glickson, J. D., and Chance, E. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7999–8008
- Cohen, D. M., and Bergman, R. N. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, E341–E350
- Malloy, C. R., Sherry, A. D., and Jeffrey, F. M. H. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, H987–H995
- Di Donato, L., Des Rosiers, C., Montgomery, J. A., David, F., Garneau, M., and Brunengraber, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4170–4180
- Beylot, M., Soloviev, M. V., David, F., Landau, B. R., and Brunengraber, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1509–1514
- Lopaschuk, G. D., and Saddik, M. (1992) *Mol. Cell. Biochem.* **116**, 111–116
- Renstrom, B., Nellis, S. H., and Liedke, A. J. (1990) *Circ. Res.* **66**, 282–288
- Weiss, R. G., Chacko, V. P., and Gerstenblith, G. (1989) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **21**, 469–478
- McVeigh, J. J., and Lopaschuk, G. D. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, H1079–H1085
- Jeffrey, F. M., Diczku, V., Sherry, A. D., and Malloy, C. R. (1995) *Basic Res. Cardiol.* **90**, 388–396
- Weiss, R. G., Chacko, V. P., Glickson, J. D., and Gerstenblith, G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6426–6430
- Barron, J. T., Kopp, S. J., Tow, J., and Parillo, J. E. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, H764–H769
- Russell, R. R., III, and Taegtmeyer, H. (1991) *Am. J. Physiol.* **261**, H1756–H1762
- Peuhkurinen, K. J., Nuutinen, E. M., Pietiläinen, E. P., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1982) *Biochem. J.* **208**, 577–581
- Sundqvist, K. E., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1989) *Biochem. J.* **257**, 913–916
- Peuhkurinen, K. J., and Hassinen, I. E. (1982) *Biochem. J.* **202**, 67–76
- Bünger, R., Mallet, R. T., and Hartman, D. A. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**,

³ Using our mix of ¹³C-substrates, Equation 9 is likely to overestimate the MF values of $\text{OAA}_{M3}^{\text{PR}}$. Indeed, in the first term of Equation 9, it is assumed that all citrate isotopomers labeled with two ¹³C in their acetyl moiety and with one ¹³C in their OAA moiety are formed in equal proportion. However, under our conditions, M1 OAA isotopomers arise predominantly from [1-¹³C]octanoate (compare the MPE M1 of the OAA moiety of citrate for heart perfusions shown in Table II, A and B). Thus, they are labeled with ¹³C on carbon 1 or 4. After condensation with M2 acetyl-CoA, they form M3 citrate isotopomers labeled on carbons 1, 4, and 5 or 4, 5, and 6. Upon further metabolism in the CAC, these M3 citrate isotopomers are converted to M2 (not M3) OAA isotopomers.

- 221-233
32. Jessen, M. E., Kovarik, T. E., Jeffrey, F. M. H., Sherry, A. D., Storey, C. J., Chao, R. Y., Ring, W. S., and Malloy, C. R. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 831-839
 33. Comte, B., Jetté, M., Cordeau, S., and Des Rosiers, C. (1995) *Circulation* **92**, 1-770 (abstr.)
 34. Vincent, G., Comte, B., and Des Rosiers, C. (1997) *FASEB J.* **11**, 269 (abstr.)
 35. Comte, B. and Des Rosiers, C. (1997) *FASEB J.* **11**, 268 (abstr.)
 36. Des Rosiers, C., Montgomery, J. A., Desrochers, S., Garneau, M., David, F., Mamer, O. A., and Brunengraber, H. (1988) *Anal. Biochem.* **173**, 96-105
 37. Des Rosiers, C., Fernandez, C. A., David, F., and Brunengraber, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27179-27182
 38. Laplante, A., Vincent, G., Poirier, M., and Des Rosiers, C. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, E74-E82
 39. Katz, J., Lee, W.-N. P., Wals, P. A., and Bergner, E. A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12994-13001
 40. Cline, G. W., and Shulman, G. I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28062-28067
 41. Malloy, C. R., Sherry, A. D., and Jeffrey, F. M. H. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, H987-H995
 42. Brunet, J., Boily, M. J., Cordeau, S., and Des Rosiers, C. (1995) *Free Radical Biol. & Med.* **19**, 627-638
 43. Laplante, A., Comte, B., and Des Rosiers, C. (1995) *Anal. Biochem.* **224**, 580-587
 44. Plummer, D. T. (1971) *An Introduction to Practical Biochemistry*, pp. 313-320, McGraw-Hill Book Co., London
 45. LaNoue, K., Nicklas, W. J., and Williamson, J. R. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 102-111
 46. Sluse, F. E., Meijer, A. J., and Tager, J. M. (1971) *FEBS Lett.* **18**, 149-153
 47. Kerby, A. L., Randle, P. J., Cooper, R. H., Whitehouse, S., Pask, H. T., and Denton R. M. (1976) *Biochem. J.* **154**, 327-348
 48. Brosnan, J. T., and Reid, K. (1985) *Metabolism* **34**, 588-593
 49. Neely, J. R., and Morgan, H. E. (1974) *Annu. Rev. Physiol.* **36**, 413-459
 50. Lewandowski, E. D. (1992) *Biochemistry* **31**, 8916-8923
 51. Peuhkurinen, K. J., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1983) *Biochem. J.* **210**, 193-198
 52. Gamble, J., and Lopaschuk, G. D. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1225**, 191-199
 53. Des Rosiers, C., David, F., Garneau, M., and Brunengraber, H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1574-1578
 54. Schulz, H. (1994) *J. Nutr.* **124**, 165-171
 55. Lewandowski, E. D., and Johnston, D. L. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, H1357-H1365
 56. Saddik, M., Gamble, J., Witters, L. A., and Lopaschuk, G. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25836-25845
 57. Abdel-aleem, S., Nada, M. A., Sayed-Ahmed, M., Hendrickson, S. C., St Louis, J., Walthall, H. P., and Lowe, J. E. (1996) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 825-833
 58. Kelleher, J. K., Kharroobi, A. T., Aldaghlas, T. A., Shambat, I. B., Kennedy, K. A., Holleran, A. L., and Masterson, T. M. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, E384-E395
 59. David, F., Beylot, M., Reider, M. W., Anderson, V. E., and Brunengraber, H. (1994) *Anal. Biochem.* **218**, 143-148
 60. Khan, A., Ling, Z. C., and Landau, B. R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2539-2542
 61. Comte, B., Vincent, G., Bouchard, B., Jetté, M., Cordeau, S., and Des Rosiers, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, acc art., 461405

A ^{13}C Mass Isotopomer Study of Anaplerotic Pyruvate Carboxylation in Perfused Rat Hearts*

(Received for publication, February 13, 1997, and in revised form, August 8, 1997)

Blandine Comte‡, Geneviève Vincent§, Bertrand Bouchard, Manon Jetté, Sylvie Cordeau, and Christine Des Rosiers‡§¶

From the Departments of ‡Nutrition and §Biochemistry, University of Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Anaplerotic pyruvate carboxylation was examined in hearts perfused with physiological concentrations of glucose, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{lactate}$, and $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{pyruvate}$. Also, a fatty acid, $[\text{1-}^{13}\text{C}]\text{octanoate}$, or ketone bodies were added at concentrations providing acetyl-CoA at a rate resulting in either low or substantial pyruvate decarboxylation. Relative contributions of pyruvate and fatty acids to citrate synthesis were determined from the ^{13}C labeling pattern of effluent citrate by gas chromatography-mass spectrometry (see companion article, Comte, B., Vincent, G., Bouchard, B., and Des Rosiers, C. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26117–26124). Precision on flux measurements of anaplerotic pyruvate carboxylation depended on the mix of substrates supplied to the heart. Anaplerotic fluxes were precisely determined under conditions where acetyl-CoA was predominantly supplied by β -oxidation, as it occurred with 0.2 or 1 mM octanoate. Then, anaplerotic pyruvate carboxylation provided 3–8% of the OAA moiety of citrate and was modulated by concentrations of lactate and pyruvate in the physiological range. Also, the contribution of pyruvate to citrate formation through carboxylation was equal to or greater than through decarboxylation. Furthermore, ^{13}C labeling data on tissue citric acid cycle intermediates and pyruvate suggest that (i) anaplerosis occurs also at succinate and (ii) cataplerotic malate decarboxylation is low. Rather, the presence of citrate in the effluent perfusate of hearts perfused with physiological concentrations of glucose, lactate, and pyruvate and concentrations of octanoate leading to maximal oxidative rates suggests a cataplerotic citrate efflux from mitochondria to cytosol. Taken altogether, our data raise the possibility of a link between pyruvate carboxylation and mitochondrial citrate efflux. In view of the proposed feedback regulation of glycolysis by cytosolic citrate, such a link would support a role of anaplerosis and cataplerosis in metabolic signal transmission between mitochondria and cytosol in the normoxic heart.

In the heart, the existence of anaplerotic and cataplerotic processes is illustrated by the rapid changes in combined pool size of citric acid cycle (CAC)¹ intermediates occurring under

various conditions, such as altered fuel substrates or work load and ischemia (1–6). Anaplerotic substrates include pyruvate (supplied as such or derived from glucose (7)), propionate (8), aspartate, glutamate, and the branched chain amino acids (9). Evidence supports the importance of anaplerosis, especially from glutamate and aspartate, for heart function in ischemia-reperfusion (4, 8, 10–11). Less is known about the role and site(s) of anaplerosis and cataplerosis in the heart under normoxia. Regulation of pool sizes by means of anaplerotic and cataplerotic reactions is likely to be involved not only in feedback control of the turnover of the cycle itself (1, 8) but also in the transmission of signals between mitochondria and the cytosol. The latter is illustrated by the possibility of feedback inhibition of phosphofructokinase by cytosolic citrate accumulating during fatty acid oxidation (12–13). However, in the heart, the significance of this regulatory mechanism is questioned because of the low activity of the tricarboxylate transporter (14–15).

Anaplerotic pyruvate carboxylation prevented the contractile dysfunction of hearts perfused with ketone bodies (KB; 16–17). *In vivo*, the normoxic heart could rely on blood lactate and pyruvate for anaplerosis. In the isolated heart, the constant need for anaplerotic substrates is illustrated by the decrease in tissue levels of glutamate, or aspartate, upon perfusion with glucose alone, or glucose and long chain fatty acid, respectively (4, 8). Anaplerosis from pyruvate can occur through either pyruvate carboxylase or NADP-malic enzyme. The relative contribution of these reactions is debated (12, 18–19). Since pyruvate carboxylase and malic enzyme are differentially regulated (20–22), they may operate under different circumstances. Aside from oxaloacetate (OAA), pyruvate also supplies acetyl-CoA to the CAC. Both pyruvate carboxylation and decarboxylation were linked to some beneficial effects on heart function (16, 23–27), although the partitioning of pyruvate through these two reactions remains to be clarified. Using ^{14}C - and ^{13}C -labeled substrates, several authors documented the reciprocal regulation of pyruvate decarboxylation and fatty acid oxidation (see for example Refs. 25, and 28–30). However, in these studies, the relative contributions of pyruvate decarboxylation and carboxylation to citrate formation could not be assessed directly because of methodological limitations.

Here we report data on simultaneous measurements of pyruvate carboxylation and decarboxylation, and of fatty acid oxidation, using a strategy described in the companion article (Comte *et al.* (67)). This was achieved using ^{13}C -substrate(s) and analyzing the ^{13}C labeling pattern of effluent citrate by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). Our ^{13}C data

* This work was supported by the Medical Research Council of Canada Grants MA-9575 and MT-10920 (to C. D. R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Laboratory of Intermediary Metabolism, Y-3616, Pavillon Notre-Dame, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 1560 Sherbrooke St. East, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1. Tel.: 514-281-6000 (ext. 7477); Fax: 514-896-4762; E-mail: [redacted].

¹ The abbreviations used are: CAC, citric acid cycle; AcAc, acetoacetate; αKG , α -ketoglutarate; BHB, β -hydroxybutyrate; CS, citrate syn-

thesis; DCA, dichloroacetate; GCMS, gas chromatography-mass spectrometry; KB, ketone body; MID, mass isotopomer distribution; MPE, molar percent enrichment; NE, norepinephrine; OAA, oxaloacetate; PC, pyruvate carboxylation; PDC, pyruvate decarboxylation.

show how the contributions of anaplerotic OAA and acetyl-CoA from pyruvate for citrate formation are modulated by the nature and the concentration of substrates feeding the CAC. They also suggest another site of anaplerosis as well as probable sites for cataplerosis. Part of this work was presented in abstract form (31–33).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals—Chemicals, enzymes, and coenzymes were purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Quebec), Fisher (Montreal, Quebec), Sigma, and Anachemia (Dorval, Quebec). [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]lactate (99%), [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate (99%), and [$1\text{-}^{13}\text{C}$]octanoate (99%) were obtained from Isotec (Miamisburg, OH) and Cambridge Isotopes Laboratories (Woburn, MA). The derivatization agent *N*-methyl-*N*-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide was supplied by Regis Chemical (Morton Grove, IL). Acetoacetate (AcAc) was prepared as described previously (34). All solutions were made with water purified by a "Milli-Q" system (Millipore, St. Laurent, Quebec).

Heart Perfusions—Procedures for isolation and perfusion of rat hearts were as described in previous publications (35, and Comte *et al.* (67)). Briefly, hearts from fed male Sprague-Dawley rats (Charles River, Quebec) weighing 120–220 g (heart wet weight, 1.1–1.3 g) were perfused according to the Langendorff technique at a constant pressure of 80 mmHg with a non-circulating modified Krebs-Ringer bicarbonate buffer (in mM: 119 NaCl, 4.8 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 11 glucose, 0.5 or 1 lactate, 0.05 or 0.2 pyruvate, 0.02, 0.2, or 1 octanoate, 0.15 AcAc, 0.15 β -hydroxybutyrate (BHB) \pm 0.001 norepinephrine (NE) or 1 dichloroacetate (DCA)). The perfusion buffer was gassed with 95% O₂:5% CO₂ (pH 7.4) at 38 °C. Functional parameters were monitored continuously as described previously (36 and Comte *et al.* (67)).

Perfusion Protocols with ^{13}C -Substrates—After a 15–20-min equilibration period, unlabeled lactate, pyruvate, and octanoate were replaced by 99% [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]lactate, [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate, and when indicated, [$1\text{-}^{13}\text{C}$]octanoate and perfusion was continued for another 40 min. When used, DCA was present throughout the experiment, whereas infusion of NE was started 10 min before the labeling period. Perfusate NE concentration was kept constant despite variations in coronary flow using a computer program (37) developed for feedback control of a syringe pump (Harvard Instruments, Southnatick, MA). Samples of effluent perfusate (20 ml) were collected every 5 min starting 10 min before the labeling period and processed as follows: (i) 7 ml was immediately made with 10 mM hydroxylamine-hydrochloride and sonicated for 1 min to convert α -ketoglutarate (α KG) to its oxime derivative (36), (ii) 10 ml was made 1% sulfosalicylic acid, and (iii) 1 ml was left untreated. Samples were stored at –20 °C until further analyses. At the end of the experiment, hearts were freeze-clamped and stored in liquid nitrogen.

GCMS Assays—Procedures for determination of the ^{13}C -mass isotopomer distribution (MID) of tissue and effluent metabolites (citrate, OAA, and acetyl moieties of citrate, α KG, succinate, malate, fumarate, and pyruvate) are described in the accompanying report (67). MID data are expressed as mol fraction (MF) or molar percent enrichment (MPE). The MF in a given mass isotopomer (M_i) is $\text{MF}(M_i) = A_i / (\sum A_i)$, where A represents the peak area of each fragmentogram, determined by computer integration and corrected for naturally occurring heavy isotopes (38–39), and i ranges from 0 to n , n being the number of carbon atoms. MPE is equivalent to $\text{MF} \times 100$. The concentration of KB (AcAc + BHB) was determined using an internal standard of [$^2\text{H}_6$]BHB as described previously (34), in effluent perfusates treated with 1 M NaBH₄ (500 μ l/10 ml: to reduce AcAc to BHB).

Other Assays—The concentrations of lactate and pyruvate were determined enzymatically (40) in neutralized sulfosalicylic acid influent and effluent perfusates. The concentration of octanoate was determined using a kit (NEFA C, ACS-ACOD method, Wako, VA), in untreated perfusates.

Calculations—Equations to calculate the relative contributions of pyruvate and octanoate to citrate formation from the ^{13}C labeling pattern of citrate released from hearts perfused with [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]lactate, [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate, and [$1\text{-}^{13}\text{C}$]octanoate are presented in the accompanying report (67). Note that in the present report, we will refer to these equations using the same numbering.

Statistical Analysis—Individual enrichments are averages of three to five GCMS injections. Data are expressed as means \pm S.E. when $n > 2$ or S.D. when $n = 2$ perfusions. Hearts perfused with 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.2 mM octanoate were taken as controls. Statistical significance at $p < 0.05$ was assessed using a one-way analysis of

variance followed by a Bonferroni multiple comparison test, unless otherwise specified.

RESULTS AND DISCUSSION

Anaplerotic pyruvate carboxylation was examined in hearts perfused with physiological concentrations of glucose (11 mM), lactate (0.5–1 mM), and pyruvate (0.05–0.2 mM). Lactate and pyruvate were present in a fixed ratio to clamp the redox state. Also, a source of acetyl-CoA other than pyruvate, either the medium chain fatty acid, octanoate, or the KB, AcAc, and BHB, was provided. Medium chain fatty acids is not subjected to carnitine palmitoyltransferase I regulation (41–43). Thus, the perfusate octanoate concentration sets the rate of mitochondrial acetyl-CoA generation. In a first series of heart experiments, octanoate was supplied at 0.2 mM or greater, leading to maximal rate of β -oxidation (41–42) and thus of acetyl-CoA formation. This should favor (i) pyruvate carboxylation over its decarboxylation and (ii) citrate synthesis from OAA formed by anaplerotic pyruvate carboxylation. Under these conditions, we attempted to increase substrate flux through pyruvate decarboxylation by adding known activators of pyruvate dehydrogenase, either 1 mM DCA or 1 μ M NE. However, results obtained prompted us to favor pyruvate decarboxylation by decreasing the supply of acetyl-CoA from sources other than pyruvate. Thus, in a second series of experiments, hearts were supplied with either 0.02 mM octanoate, leading to submaximal rate of oxidation, or with 0.15 mM AcAc and 0.15 mM BHB. For simplicity, data obtained in these two series of experiments are presented sequentially.

Conditions Favoring Pyruvate Carboxylation Over Decarboxylation

Metabolic and Functional Status of Perfused Hearts—Hearts perfused with physiological concentrations of glucose, lactate, and pyruvate and concentrations of octanoate leading to maximal oxidative rates (*i.e.* ≥ 0.2 mM, Ref. 44) maintained spontaneous beating at 305 ± 14 beats/min, a coronary flow rate of 10.0 ± 0.5 ml/min, and a rate pressure product of $(23.1 \pm 1.9) \times 10^3$ mmHg \times beats/min ($n = 14$). The latter parameter was increased significantly by the addition of NE ($(33.6 \pm 2.8) \times 10^3$, $n = 3$). In a previous study, similarly perfused rat hearts consumed oxygen at a rate varying between 3.7 and 5 μ mol/min (37) and released minimal quantity of lactate dehydrogenase or glutathione (45). Rates of pyruvate, lactate, or glucose uptake in a single pass could not be calculated from the influent and effluent concentrations since the differences were too small to be measured with precision. Rates of octanoate uptake were similar under all conditions tested, on average 0.57 ± 0.05 μ mol/min ($n = 17$, ranging from 0.24 to 0.86). These rates are in agreement with literature values (44). Finally, KB (AcAc + BHB) were released into the effluent perfusate at rate of 258 ± 13 nmol/min ($n = 9$, Ref. 32). Although the heart is normally a net consumer of KB, pseudoketogenesis can occur via the reversal of the succinyl-CoA transferase reaction (46). We interpret this KB release as reflecting acetyl-CoA spillover from the CAC.

^{13}C Labeling of CAC Metabolites—Table I and Fig. 1 show the ^{13}C labeling of tissue pyruvate and of various CAC metabolites when hearts were perfused for 40 min with physiological concentrations of [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]lactate, [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate, and 0.2 or 1 mM [$1\text{-}^{13}\text{C}$]octanoate under various conditions. The MPE of influent pyruvate was $96.6 \pm 0.4\%$ in M3, $3.0 \pm 0.2\%$ in M2, and $0.03 \pm 0.02\%$ ($n = 3$) in M1 isotopomers. The effluent pyruvate was slightly diluted (MPE M3: $86 \pm 1\%$). Tissue pyruvate showed even more dilution of M3 isotopomers (from 61 to 85%; Table I). When corrected for the presence of M2 and M1 isotopomers in the infused pyruvate, tissue pyruvate en-

Anaplerosis from Pyruvate in Heart

 TABLE I
¹³C labeling of tissue pyruvate

Other data from heart perfusion experiments described in Figs. 1 and 2. Hearts were freeze-clamped and processed for the analysis of the ¹³C labeling of tissue pyruvate by GCMS. Data, corrected for natural abundance in heavy isotopes and light isotopic impurities of the tracer, are expressed as MPE and are means ± S.E. (*n* > 2) or S.D. (*n* = 2).

| Perfusion conditions (<i>n</i>) | MPE tissue pyruvate | | |
|---|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | M1 | M2 | M3 |
| 1 mM [U- ¹³ C ₃]lactate + 0.2 mM [U- ¹³ C ₃]pyruvate | | | |
| + 0.2 or 0.02 mM [1- ¹³ C]octanoate (3) | 0.23 ± 0.11 | 0.01 ± 0.01 | 72.1 ± 1.5 |
| + 0.2 mM [1- ¹³ C]octanoate + 1 mM DCA (5) | 0.19 ± 0.02 ^a | 0.00 ± 0.00 | 85.1 ± 2.5 ^b |
| + 0.2 mM [1- ¹³ C]octanoate + 1 μM NE (4) | 0.20 ± 0.07 | 0.05 ± 0.02 | 65.6 ± 0.7 |
| 0.5 mM [U- ¹³ C ₃]lactate + 0.05 mM [U- ¹³ C ₃]pyruvate | | | |
| + 0.2 mM [1- ¹³ C]octanoate (4) | 0.10 ± 0.05 | 0.22 ± 0.14 | 63.1 ± 2.7 ^b |
| + 1 mM [1- ¹³ C]octanoate (2) | 1.04 ± 0.50 | 0.51 ± 0.51 | 61.5 ± 2.4 ^b |
| + 0.15 mM (AcAc + BHB) (4) | 0.17 ± 0.05 ^a | 0.28 ± 0.04 ^a | 48.8 ± 4.9 ^b |

^a *p* < 0.05: means tested against the null hypothesis.

^b *p* < 0.05, all conditions versus 1 mM lactate + 0.2 mM pyruvate + 0.2 or 0.02 mM octanoate, using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple comparison test.

richment in M2 or M1 isotopomers was negligible (not significant, means tested against null hypothesis) or very low (MPE M1 = 0.2% with DCA).

Of all tissue CAC metabolites, citrate showed the highest total ¹³C enrichment (*p* < 0.001), predominantly M1, M2, and M3 isotopomers (Fig. 1). The enrichments in M4, M5, and M6 citrate were less than 1.5, 0.2, and 0.1%, respectively, under all conditions tested. The total MPE decreased from citrate to αKG and succinate: a greater difference was observed between αKG and succinate than between citrate and αKG (1.5 versus 1.1-fold, respectively). These differences in total MPEs reflect in part the conversion of labeled to unlabeled isotopomers in the CAC due to the loss of ¹³CO₂. When this process is taken into account, the ¹³C dilution attributed to entry of unlabeled αKG and/or succinate was estimated (from Eq. 10, Comte *et al.* (67)) to be 1.13 ± 0.04 (*p* < 0.05, *n* = 8) and was similarly increased by NE and DCA (1.29 ± 0.03, *n* = 9; *p* < 0.05 unpaired *t* test).

In all cases, the enrichments in M3, M2, and M1 isotopomers of tissue citrate were not significantly different from that of effluent citrate at 25–40 min of perfusion (not shown; paired *t* test), a time when isotopic steady state was attained (see Comte *et al.* (67)). A similar ¹³C enrichment was also observed for tissue and effluent αKG (not shown). Furthermore, the total ¹³C enrichment and the ¹³C MID of the OAA moiety of effluent citrate were similar to that of tissue malate or fumarate (Fig. 1). These data indicate rapid isotope randomization through the reversible fumarase reaction. Note that tissue fumarate and malate, and the OAA moiety of effluent citrate, are more enriched in M3 isotopomers (Fig. 1D) than tissue succinate. This can only be explained by an entry of M3 isotopomers at the level of malate or OAA by anaplerotic carboxylation of [U-¹³C₃]pyruvate.

Relative Contributions of Pyruvate to Carboxylation and Decarboxylation—The ¹³C enrichment of tissue pyruvate and of the acetyl and OAA moieties of citrate, isolated from the effluent of hearts perfused for 25–40 min with [U-¹³C₃]lactate, [U-¹³C₃]pyruvate, and [1-¹³C]octanoate, allows calculation of relative substrate fluxes relevant to pyruvate and fatty acid metabolism. Under these conditions, all assumptions on which equations were developed were validated (see Comte *et al.* (67)).

From the M3 enrichment of tissue pyruvate, we calculate that more than 60% of the pyruvate converted to OAA arose from exogenously supplied pyruvate and/or lactate (FC_{PYRe→PYRi}; Eq. 3 of Ref. 67; where FC is fractional contribution; PYRi and PYRe indicate intracellular and extracellular pyruvate). The percent contribution of glucose and/or glycogen to pyruvate generation (1 - FC_{PYRe→PYRi}) was 33.8 ± 1.6% in

all conditions, except with 1 mM DCA where it was decreased significantly to 14.4 ± 2.5% (*p* < 0.001, unpaired *t* test). These changes support an inhibitory (47) rather than a stimulatory (25, 48–51) effect of DCA on glycolysis under our perfusion conditions.

From the M1 and M2 enrichment of the acetyl moiety of effluent citrate, we calculate that in all cases, close to 90% of the acetyl moiety of citrate was supplied by octanoate oxidation (octanoate oxidation/citrate synthesis (CS) = 0.89 ± 0.03%, *n* = 17, Eq. 6 of Ref. 67, not shown). The contribution of pyruvate decarboxylation to acetyl-CoA formation was less than 5% (PDC/CS, Table IIA) and was not significantly modified by 1 mM DCA or 1 μM NE or by increasing the octanoate concentration to 1 mM. Most likely, conversion of pyruvate dehydrogenase to the active form in hearts perfused with 0.2 mM octanoate requires a higher concentration of DCA (*i.e.* 5 mM) and/or of pyruvate (*i.e.* 10 mM; Ref. 52).

To calculate the contribution of anaplerotic pyruvate carboxylation to citrate synthesis, the measured M3 enrichment of the OAA moiety of citrate was corrected for the formation of M3 OAA isotopomers through metabolism in the CAC of citrate precursor molecules. The magnitude of this correction was between 16 and 25% of the measured enrichment values (Table IIA). Then, the contribution of anaplerotic pyruvate carboxylation to citrate synthesis varied between 3.4 and 7.4% (PC/CS; Table IIA). Among the various interventions studied, only a change in the concentration and/or ratio of lactate and pyruvate significantly modified the PC/CS flux ratio (*p* < 0.05). The contribution of pyruvate to citrate formation through carboxylation was equal to or greater than through decarboxylation (PC/PDC, Table IIA). Variations in the PC/PDC ratios observed with NE (*p* < 0.05) and 1 mM octanoate (*p* < 0.05) were in agreement with the known effects of these interventions on the pyruvate dehydrogenase complex (*i.e.* activation and inhibition, respectively).

Rates of octanoate uptake, expressed in acetyl-CoA units (Equation 1, below), were used to convert the relative flux ratios (PC/octanoate oxidation; Eq. 4/Eq. 6 of Ref. 67) into absolute fluxes. Rates were corrected for KB release. Indeed, GCMS assay of effluent KB M1 enrichments, which resemble those of the acetyl moiety of citrate, indicated that KB were formed from [1-¹³C]octanoate oxidation (32).

Rates of acetyl-CoA formation from octanoate oxidation (μmol/min)

$$= (\text{rate of octanoate uptake } (\mu\text{mol/min}) \times 4) -$$

$$(2 \times \text{rate of KB release } (\mu\text{mol/min})) \quad (\text{Eq. 1})$$

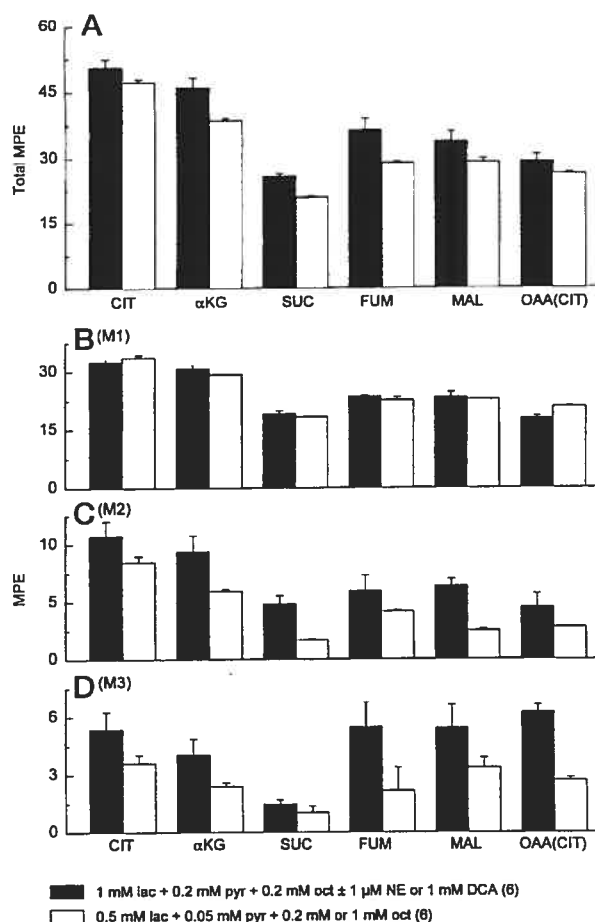


FIG. 1. Total ^{13}C labeling of tissue CAC intermediates isolated from hearts perfused with a mix of ^{13}C -substrates under conditions favoring pyruvate carboxylation over decarboxylation. Hearts were perfused for 40 min under normoxia with non-recirculating buffer containing physiological concentrations of glucose, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ (lactate + pyruvate), and concentrations of $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ octanoate leading to maximal oxidative rates, in the absence or presence of $1\ \mu\text{M}$ NE or $1\ \text{mM}$ DCA. Hearts were freeze-clamped and processed for the analysis of ^{13}C labeling of tissue CAC metabolites by GCMS. Data are presented as follows: A, total MPE in all ^{13}C -labeled mass isotopomers and B–D, MPE of individual mass isotopomers containing one (M1: A), two (M2: B), and three (M3: C) ^{13}C . They were pooled in two groups whose enrichments for all tissue metabolites did not differ significantly: (i) $1\ \text{mM}$ lactate + $0.2\ \text{mM}$ pyruvate + $0.2\ \text{mM}$ octanoate \pm NE or DCA ($n = 6$), and (ii) $0.5\ \text{mM}$ lactate + $0.05\ \text{mM}$ pyruvate + 0.2 or $1\ \text{mM}$ octanoate ($n = 6$). Data are means \pm S.E. CIT, citrate; SUC, succinate; FUM, fumarate; MAL, malate; lac, lactate; oct, octanoate; pyr, pyruvate.

Also a minimal estimate of the CAC flux was calculated as the sum of acetyl-CoA production from pyruvate decarboxylation and octanoate oxidation (Equations 5 and 6, Comte *et al.* (67)). Absolute rates of pyruvate carboxylation were similar in all conditions, on average $0.14 \pm 0.02\ \mu\text{mol}/\text{min}$ ($n = 14$). These values are in agreement with those reported by others (18–20, 53) assuming a (dry weight)/(wet weight) ratio of 7.7 (18). Minimal estimates of CAC flux were on average $1.96 \pm 0.26\ \mu\text{mol}/\text{min}$. These values are also in agreement with those of others (9, 28, 41, 54–57) and with measured rates of oxygen consumption (37) for similarly perfused rat hearts. Note that the conversion of relative to absolute fluxes assumes that all the octanoate molecules taken up by the heart are completely oxidized. Unlike long chain fatty acids, medium chain fatty acids such as octanoate are not esterified in the heart but are completely oxidized, at least under aerobic conditions (42, 44).

Alternatively, conversion of relative fluxes to absolute fluxes could be achieved using measured rates of oxygen consumption.

Conditions Favoring Pyruvate Decarboxylation Over Carboxylation

In a second series of experiments, pyruvate carboxylation was examined under conditions where substrate flux through pyruvate decarboxylation was increased by perfusing hearts with $0.02\ \text{mM}$ octanoate or $0.3\ \text{mM}$ KB (AcAc and BHB).

^{13}C Labeling of CAC Metabolites—Table I and Fig. 2 show the ^{13}C labeling of tissue pyruvate and various CAC metabolites when hearts were perfused for 40 min with physiological concentrations of $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ lactate, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ pyruvate, and either $0.02\ \text{mM}$ $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ octanoate or $0.3\ \text{mM}$ KB. Similar to experiments with $0.2\ \text{mM}$ octanoate described above (Fig. 1), most of the ^{13}C dilution occurred between αKG and succinate. The ^{13}C dilution estimated from ^{13}C enrichments in citrate and succinate using Equation 10 of Ref. 67 was 1.34 ± 0.02 ($n = 2$) and 1.38 ± 0.06 ($n = 4$), respectively. Also, the ^{13}C MID of tissue citrate was similar to that of effluent citrate after a 25–40-min perfusion period (not shown, using a paired *t* test). However, precise analysis of the ^{13}C MID of citrate released by hearts perfused with KB required twice the volume of perfusate (14 instead of 7 ml), suggesting a lower citrate release rate. In addition, the following differences were noted between the ^{13}C data obtained in the two series of perfusions. (i) Although tissue pyruvate was predominantly enriched in M3 isotopomers, a low but significant enrichment in M1 and M2 isotopomers was detected in hearts perfused with KB (Table I). (ii) Tissue citrate was enriched in M4, M5, and M6 isotopomers (11.4 ± 0.7 , 7.5 ± 2.7 , and $5.0 \pm 4.2\%$, with $0.02\ \text{mM}$ octanoate ($n = 2$), and 3.8 ± 0.5 , 1.5 ± 0.3 , 0.2 ± 0.1 with $0.3\ \text{mM}$ KB ($n = 4$)). This indicates that a significant proportion of citrate molecules are labeled in both their acetyl and OAA moieties (45 ± 2 , $n = 2$, compared with 25 ± 1 , $n = 21$, for hearts perfused with $0.2\ \text{mM}$ octanoate, $p < 0.001$). Finally, (iii) the M3 enrichments of the OAA moiety of citrate and of tissue malate and fumarate were not significantly different from that of tissue succinate. This indicates substantial formation of M3 OAA through the metabolism of citrate isotopomers in the CAC.

Relative Contributions of Pyruvate to Carboxylation and Decarboxylation—As shown in Table IIB, perfusion of hearts with physiological concentrations of glucose, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ lactate, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ pyruvate, and $0.02\ \text{mM}$ $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ octanoate or unlabeled $0.3\ \text{mM}$ KB resulted in an increased flux through pyruvate decarboxylation. Under both conditions, as much as 36% of the acetyl moiety of citrate was supplied by pyruvate decarboxylation (PDC/CS, Table IIB). Also, pyruvate decarboxylation predominated over pyruvate carboxylation (PC/PDC, Table IIB). Tissue pyruvate arose predominantly from external pyruvate and/or lactate ($\text{FC}_{\text{PYRE} \rightarrow \text{PYRi}} = 0.73 \pm 0.01$; Equation 3 of Ref. 67) in the presence of $0.02\ \text{mM}$ octanoate, whereas more than 50% was formed through glycolysis from glucose and/or glycogen ($1 - \text{FC}_{\text{PYRE} \rightarrow \text{PYRi}} = 0.52 \pm 0.05$) in the presence of KB. In hearts perfused with $0.02\ \text{mM}$ octanoate, which showed very low KB release ($3 \pm 2\ \text{nmol}/\text{min}$, $n = 4$, Ref. 32), 20% (mean of 35 and 6; $n = 2$) of the acetyl moiety of citrate was supplied by octanoate oxidation leaving 44% for the contribution of other sources, most likely long chain fatty acids. In hearts perfused with KB, the contribution of KB to acetyl-CoA formation was not evaluated but is likely to be substantial (58).

The contribution of pyruvate carboxylation to citrate synthesis in hearts perfused with $0.02\ \text{mM}$ octanoate or $0.3\ \text{mM}$ KB was not significantly different from those perfused with $0.2\ \text{mM}$ octanoate (PC/CS; Table II). However, with $0.02\ \text{mM}$ octanoate

Anaplerosis from Pyruvate in Heart

TABLE II
M3 enrichments of the OAA moiety of effluent citrate and flux ratios determined in hearts perfused with ^{13}C substrates under conditions of low (A) or substantial (B) pyruvate decarboxylation

Other data from heart perfusions described in Figs. 1 and 2. The measured M3 MPE of the OAA moiety of citrate is reported before (first column) and after (second column, in parentheses) correction for the formation of M3 OAA from CAC metabolism of some citrate isotopomers. Corrected values were calculated assuming that the ^{13}C dilution in the CAC was either negligible (min) or equal to that estimated from the enrichments of tissue citrate and succinate (max; Equations 8–10; Comte *et al.* (67)). Then, corrected M3 MPEs of the OAA moiety of citrate (max), M1 and M2 MPEs of the acetyl moiety of citrate, and M3 MPEs of tissue pyruvate (Table I) were used to calculate the following flux ratios (Equations 4–5; Comte *et al.* (67)): (i) (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis) (PC/CS, Equation 4); (ii) (pyruvate decarboxylation)/(citrate synthesis) (PDC/CS, Equation 5); and (iii) (pyruvate carboxylation)/(pyruvate decarboxylation) (PC/PDC, Equation 4/Equation 5). Data are means \pm S.E.

| Perfusion conditions (n) | MPE OAA, measured M3 (min–max) | Flux ratios | | |
|---|--|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| | | PC/CS | PDC/CS | PC/PDC |
| A. 1 mM [$^{13}\text{C}_3$]lactate + 0.2 mM [$^{13}\text{C}_3$]pyruvate | | | | |
| + 0.2 mM [^{13}C]octanoate (8) | 5.54 \pm 0.80 (4.37–4.55) | 0.063 \pm 0.009 | 0.041 \pm 0.012 | 2.79 \pm 0.7 |
| + 0.2 mM [^{13}C]octanoate + 1 mM DCA (5) | 5.73 \pm 0.25 (4.46–4.74) | 0.056 \pm 0.003 | 0.043 \pm 0.007 | 1.49 \pm 0.33 |
| + 0.2 mM [^{13}C]octanoate + 1 μM NE (4) | 5.98 \pm 0.26 (4.46–4.83) | 0.074 \pm 0.004 | 0.066 \pm 0.006 | 1.16 \pm 0.17 ^a |
| 0.5 mM [$^{13}\text{C}_3$]lactate + 0.05 mM [$^{13}\text{C}_3$]pyruvate | | | | |
| + 0.2 mM [^{13}C]octanoate (4) | 2.81 \pm 1.19 ^a (2.33–2.37) | 0.038 \pm 0.003 ^a | 0.034 \pm 0.005 | 1.17 \pm 0.18 ^a |
| + 1 mM [^{13}C]octanoate (2) | 2.51 \pm 0.26 ^a (2.11–2.09) | 0.034 \pm 0.004 ^a | 0.013 \pm 0.004 | 2.67 \pm 0.46 ^b |
| B. 1 mM [$^{13}\text{C}_3$]lactate + 0.2 mM [$^{13}\text{C}_3$]pyruvate | | | | |
| + 0.02 mM [^{13}C]octanoate (2) | 8.59 \pm 2.16 (0.66–2.67) | 0.037 \pm 0.038 ^c | 0.357 \pm 0.064 ^a | NA |
| 0.5 mM [$^{13}\text{C}_3$]lactate + 0.05 mM [$^{13}\text{C}_3$]pyruvate | | | | |
| + 0.15 mM (AcAc + BHB) (4) | 5.70 \pm 0.96 (1.79–2.84) | 0.064 \pm 0.028 | 0.374 \pm 0.059 ^a | 0.18 \pm 0.07 ^a |

^a $p < 0.05$, all conditions versus 1 mM lactate + 0.2 mM pyruvate + 0.2 mM octanoate, using a one-way analysis of variance followed by a Bonferroni multiple comparison test.

^b $p < 0.05$, 0.5 mM lactate + 0.05 mM pyruvate + 1 mM octanoate versus 0.2 mM octanoate, using an unpaired t test.

^c Nonsignificant mean tested against the null hypothesis. NA, not applicable.

or 0.3 mM KB, these flux measurements were imprecise (PC/CS, Table IIB; mean not significantly different from zero for hearts perfused with 0.02 mM octanoate). This imprecision is inherent to the use of highly enriched [$^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) under conditions where pyruvate decarboxylation is substantial. Then a high percentage of citrate isotopomers become labeled in both the acetyl and OAA moieties. Some of these citrate isotopomers are metabolized in the CAC to M3 OAA. Indeed, we estimated (Equation 10 of Comte *et al.* (67)) that only 8–50% of the measured M3 enrichment of the OAA moiety of citrate can be attributed to the carboxylation of M3 pyruvate (compared with 80–90% in hearts perfused with 0.2 or 1 mM octanoate). However, calculation of these estimates relies on the assumption of an equal contribution of the various citrate isotopomers to the formation of M3 OAA. Assessing the validity of this assumption would require more extensive modeling of the metabolism of our mix of ^{13}C -substrates in the CAC. Theoretically, one would minimize the formation of doubly labeled citrate molecules by decreasing the ^{13}C enrichment of the supplied substrate tracers. However, the lower limit on the enrichment of lactate and pyruvate is imposed by the precision with which one can measure the low enrichments of the OAA moiety of citrate. Therefore, relative flux through pyruvate carboxylation under conditions where the flux ratio PC/PDC is smaller than one remains to be precisely determined.

Physiological Considerations—Our ^{13}C data allow precise quantitation of flux through anaplerotic pyruvate carboxylation in hearts perfused with physiological concentrations of glucose, lactate, and pyruvate and concentrations of octanoate leading to low rates of pyruvate decarboxylation. Anaplerotic pyruvate carboxylation could be catalyzed by mitochondrial pyruvate carboxylase or cytosolic NADP-linked malic enzyme. Our data do not differentiate between these two processes. Since these two enzymes are differentially regulated by acetyl-CoA (7, 19, 22, 59), their relative contributions should vary with the perfusion conditions. In hearts perfused with 0.2 or 1 mM octanoate, the malic enzyme is likely to be inhibited by the high rates of acetyl-CoA generation. The activity of pyruvate carboxylase in rat heart extracts, although lower than that of

NADP-malic enzyme, can account for absolute fluxes reported in this and others studies (19–20, 52–53). Also, the modulation of the flux ratio (pyruvate carboxylation)/(citrate synthesis) by lactate and pyruvate concentrations is compatible with the kinetics of heart pyruvate carboxylase: K_m for pyruvate of 0.125 mM (20).

In addition, under all perfusion conditions studied, the ^{13}C dilution between tissue CAC metabolites (Figs. 1 and 2) suggests the presence of another site of anaplerosis aside from pyruvate carboxylation. The ^{13}C enrichments of citrate and αKG (Fig. 1) indicate a low dilution of the αKG pool through exchange or anaplerotic reactions. Such conclusion is supported by the low enrichment of αKG in M5 isotopomers (<4%) observed when hearts were perfused with <99% [$^{13}\text{C}_5$]glutamate (Comte *et al.* (67)). Most of the dilution occurred at the level of succinate. Unlabeled succinate could be formed from the branched chain amino acids, valine or isoleucine (9, 60–61). In hearts perfused in absence of these amino acids, the maximal rate of succinate formation from valine arising from proteolysis is 5 nmol \times min $^{-1}$ \times (g wet weight $^{-1}$) (9), representing about 0.2% of the estimated CAC flux. Such flux cannot account for all the ^{13}C dilution in the CAC (estimated at 1.1 with 0.2 or 1 mM octanoate, Equation 10 of Ref. 67). Thus, the anaplerotic flux at succinate (about 10% of the CAC flux in hearts perfused with 0.2 or 1 mM octanoate) would be similar to that attributed to pyruvate carboxylation (5.4 \pm 0.5%, $n = 29$). However, because of evidence pointing to a heterogeneous labeling of the myocardial pool of succinate (35), the possibility and extent of anaplerosis at the level of mitochondrial succinate remain to be investigated in experiments with ^{13}C -labeled valine or isoleucine.

Despite uncertainties about the magnitude of the anaplerotic flux at succinate, the demonstration of an active substrate flux through anaplerotic pyruvate carboxylation in hearts perfused with 0.2 or 1 mM octanoate raises the question of a site for cataplerosis. Under steady-state conditions, anaplerotic and cataplerotic fluxes should be of equal magnitude. ^{13}C NMR studies on rat hearts perfused with ^{13}C -substrates pointed out malate decarboxylation as a cataplerotic reaction (62). How-

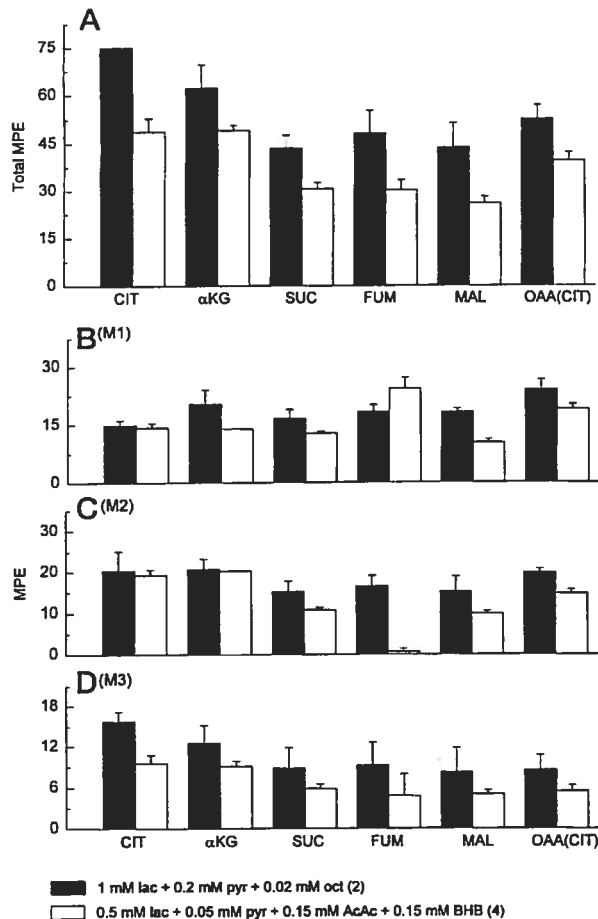


FIG. 2. ^{13}C labeling of tissue CAC intermediates isolated from hearts perfused with a mix of ^{13}C -substrates under conditions favoring pyruvate decarboxylation over carboxylation. Hearts were perfused for 40 min under normoxia with non-recirculating buffer containing physiological concentrations of glucose, $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ (lactate + pyruvate), and either (i) 0.02 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ octanoate ($n = 2$) or (ii) 0.3 mM unlabeled KB (0.15 mM AcAc + 0.15 mM BHB; $n = 4$). Hearts were freeze-clamped and processed as described in Fig. 1. Data are means \pm S.E. ($n > 2$) or S.D. ($n = 2$). Abbreviations as defined in Fig. 1 legend.

ever, our ^{13}C data (this study and Refs. 35 and 67) do not provide any evidence for the formation of pyruvate from malate in hearts perfused under normoxia with physiological concentrations of glucose, lactate, and pyruvate and a concentration of octanoate leading to maximal oxidative rates. Indeed, both tissue pyruvate and the acetyl moiety of effluent citrate showed negligible or very low enrichments in mass isotopomers expected to be formed from the metabolism of the supplied ^{13}C -substrate(s) through the reactions (malate \rightarrow pyruvate) or (malate \rightarrow pyruvate \rightarrow acetyl-CoA). For example, (i) with $[\text{U-}^{13}\text{C}_2]$ acetate, the acetyl moiety of effluent citrate was enriched in M2, but not in M1 isotopomers (see Comte *et al.* (67)); (ii) with $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ (lactate + pyruvate) and $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ octanoate, tissue pyruvate was enriched in M3, but not in M1 or M2 isotopomers (see Table I), and (iii) with 0.4 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_4]$ fumarate, tissue pyruvate was unlabeled, although it became significantly enriched in M3 isotopomers when hearts were subjected to low-flow ischemia (35). Although the ^{13}C labeling of a small pool of mitochondrial pyruvate might not be detected by GCMS assay of pyruvate in whole heart homogenates, our data nevertheless raise some doubt about the occurrence of a cataplerotic efflux at malate at least under our present perfusion conditions.

Another site for cataplerosis is citrate efflux from the mito-

chondria. The likelihood of this site in hearts perfused with a medium chain fatty acid is supported by increased tissue levels of citrate (8, 12) and by the presence of citrate in the effluent (this study). Earlier experiments with isolated rat heart mitochondria indicated that citrate accumulation and efflux from the mitochondria occurred at a very high NADH/NAD⁺ ratio or state 4 respiration by exchange with added malate (14). There was no reverse flux of citrate. In rat hearts perfused under normoxic conditions, state 4 respiration (ATP/P_i limited) prevails with octanoate (see for review Ref. 63). High citrate levels in hearts perfused with octanoate (12) probably explain citrate release in the present study. Tissue citrate levels are also increased by perfusion with long chain fatty acid, pyruvate, and by starvation and diabetes (13). These and other data led to the suggestion that accumulation of cytosolic citrate may feed back on NADH production by the cytosol by inhibiting glycolysis at the level of phosphofructokinase (12–13). In β -cells (64), and more recently in skeletal muscles (65), cytosolic citrate was proposed to be a “signal of mitochondrial fuel abundance.” Also, evidence was presented in these cells (64–65) that cytosolic citrate is a source of malonyl-CoA, an inhibitor of carnitine palmitoyltransferase I, the enzyme governing long chain fatty acid oxidation. However, in the heart, the significance of these regulatory mechanisms is questioned because of the low activity of the tricarboxylate transporter (14–15). Still this low activity is compatible with citrate efflux rates reported in this study (estimated at 50 nmol/min). Thus, on the basis of the above evidence, we speculate that the following sequence of events takes place in hearts perfused with 0.2 or 1 mM octanoate: (i) high productions of mitochondrial acetyl-CoA and NADH from octanoate oxidation inhibit pyruvate decarboxylation and favor anaplerotic pyruvate carboxylation; (ii) this sets up conditions for accumulation of tissue citrate and malate, and for citrate efflux from mitochondria to cytosol. A similar sequence of events could also occur in hearts perfused with high concentrations of long chain fatty acids, although this remains to be shown.

In conclusion, in hearts perfused with a physiological mix of ^{13}C -substrates, the labeling pattern of tissue CAC, OAA, and acetyl-CoA can be probed by that of effluent citrate. Using the ^{13}C protocol that we developed, flux through anaplerotic pyruvate carboxylation was quantitated with precision in hearts perfused with a mix of substrates where acetyl-CoA was predominantly supplied by β -oxidation. Then, anaplerotic carboxylation contributed substantially to citrate synthesis from pyruvate. Other data indicate succinate as another site for anaplerosis and raise the possibility of a cataplerotic citrate efflux from mitochondria to cytosol. In view of the role of cytosolic citrate as a modulator of glycolysis (through inhibition of phosphofructokinase; Refs. 12 and 13) and, possibly, of fatty acid metabolism (through malonyl-CoA; Refs. 43 and 66), further investigations of the relationship between anaplerotic pyruvate carboxylation and citrate efflux from mitochondria to cytosol in heart perfused with long chain fatty acids may clarify the role of anaplerosis and cataplerosis in signal transmission in the normoxic heart.

REFERENCES

1. Peuhkurinen, K. J., Takala, T. E. S., Nuutinen, E. M., and Hassinen, I. E. (1983) *Am. J. Physiol.* **244**, H281–H288
2. Peuhkurinen, K. J. (1984) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **16**, 487–495
3. Pisarenko, O. I., Studneva, I. M., Khlopov, M., Solomatina, E. S., and Ruuge, E. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **934**, 55–63
4. Weisner, R. J., Rosen, P., and Grieshaber, M. K. (1988) *Biochem. Med. Metab. Biol.* **40**, 19–34
5. Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1977) *Int. J. Biochem.* **8**, 505–509
6. Nuutinen, E. M., Peuhkurinen, K. J., Pietiläinen, E. P., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1981) *Biochem. J.* **194**, 867–875
7. Attwood, P. V. (1995) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **27**, 231–249
8. Sundqvist, K. E., Vuorinen, K. H., Peuhkurinen, K. J., and Hassinen, I. E. (1994) *Eur. Heart J.* **15**, 561–570

9. Takala, T., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1980) *Biochem. J.* **192**, 285-295
10. Taegtmeyer, H. (1978) *Circ. Res.* **43**, 808-815
11. Jessen, M. E., Kovarik, T. E., Jeffrey, F. M., Sherry, A. D., Storey, C. J., Chao, R. Y., Ring, W. S., and Malloy, C. R. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 831-839
12. Barron, J. T., Kopp, S. J., Tow, J., and Parillo, J. E. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, H764-H769
13. Garland, P. B., Randle, P. J., and Newsholme, E. A. (1963) *Nature* **200**, 169-170
14. LaNoue, K., Nicklas, W. J., and Williamson, J. R. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 102-111
15. Sluse, F. E., Meijer, A. J., and Tager, J. M. (1971) *FEBS Lett.* **18**, 149-153
16. Russell, R. R., III, and Taegtmeyer, H. (1991) *Am. J. Physiol.* **261**, H1756-H1762
17. Goodwin, G. W., Taegtmeyer, H. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, H462-H470
18. Peuhkurinen, K. J., and Hassinen, I. E. (1982) *Biochem. J.* **202**, 67-76
19. Sundqvist, K. E., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1989) *Biochem. J.* **257**, 913-916
20. Lancha, A. H., Jr., Recco, M. B., and Curi, R. (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **32**, 483-489
21. Sundqvist, K. E., Heikkilä, J., Hassinen, I. E., and Hiltunen, J. K. (1987) *Biochem. J.* **243**, 853-857
22. Utter, M. F. (1969) *Curr. Top. Cell. Regul.* **1**, 253-296
23. Bünger, R., Mallet, R. T., and Hartman, D. A. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 221-233
24. Mallet, R. T., Hartman, D. A., and Bünger, R. (1990) *Eur. J. Biochem.* **188**, 481-493
25. McVeigh, J. J., and Lopaschuk, G. D. (1990) *Am. J. Physiol.* **259**, H1079-H1085
26. Lopaschuk, G. D., Spafford, M. A., Davies, N. J., and Wall, S. R. (1990) *Circ. Res.* **66**, 546-553
27. Lewandowski, E. D., and White, L. T. (1995) *Circulation* **91**, 2071-2079
28. Chatham, J. C., Forder, J. R., Glickson, J. D., and Chance, E. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7999-8008
29. Malloy, C. R., Sherry, A. D., and Jeffrey, F. M. H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 6964-6971
30. Malloy, C. R., Sherry, A. D., and Jeffrey, F. M. H. (1987) *FEBS Lett.* **212**, 58-62
31. Comte, B., Jetté, M., Cordeau, S., Des Rosiers, C. (1995) *Circulation* **92**, I-770 (abstr.)
32. Vincent, G., Comte, B., and Des Rosiers, C. (1997) *FASEB J.* **11**, 269 (abstr.)
33. Comte, B., and Des Rosiers, C. (1997) *FASEB J.* **11**, 268 (abstr.)
34. Des Rosiers, C., Montgomery, J. A., Garneau, M., David, F., Mamer, O. A., Daloz, P., Toffolo, G., Cobelli, C., Landau, B. R., and Brunengraber, H. (1990) *Am. J. Physiol.* **258**, E519-E528
35. Laplante, A., Vincent, G., Poirier, M., and Des Rosiers, C. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, E74-E82
36. Laplante, A., Comte, B., and Des Rosiers, C. (1995) *Anal. Biochem.* **224**, 580-587
37. Montgomery, J. A., Jetté, M., Huot, S., and Des Rosiers, C. (1993) *Biochem. J.* **294**, 727-733
38. Des Rosiers, C., Di Donato, L., Comte, B., Laplante, A., Marcoux, C., David, F., Fernandez, C. A., and Brunengraber, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10027-10036
39. Des Rosiers, C., Montgomery, J. A., DesRochers, S., Garneau, M., David, F., Mamer, O. A., and Brunengraber, H. (1991) *Anal. Biochem.* **173**, 96-105
40. Williamson, D. H., and Mellanby, J. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed) Vol. 4, pp. 1836-1843, Academic Press, New York
41. Weiss, R. G., Kalil-Filho, R., Herskowitz, A., Chacko, V. P., Litt, M., Stern, M. D., and Gerstenblith, G. (1993) *Circulation* **87**, 270-282
42. Gavva, S. R., Wiethoff, A. J., Zhao, P., Malloy, C. R., and Sherry, A. D. (1994) *Biochem. J.* **303**, 847-853
43. Schulz, H. (1994) *J. Nutr.* **124**, 165-171
44. Forsey, R. G. P., Reid, K., and Brosnan, J. T. (1987) *Can. J. Pharmacol.* **65**, 401-406
45. Brunet, J., Boily, M. J., Cordeau, S., and Des Rosiers, C. (1995) *Free Radical Biol. & Med.* **19**, 627-638
46. Fink, G., Desrochers, S., Des Rosiers, C., Garneau, M., David, F., Daloz, T., Landau, B. R., and Brunengraber, H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18036-18042
47. Clark, A. S., Mitch, W. E., Goodman, M. N., Fagan, J. M., Goheer, M. A., and Curnow, R. T. (1987) *J. Clin. Invest.* **79**, 588-594
48. Reed, L. J. (1981) *Curr. Top. Cell. Regul.* **18**, 95-106
49. Stacpoole, P. W. (1989) *Metabolism* **38**, 1124-1144
50. Gamble, J., and Lopaschuk, G. D. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1225**, 191-199
51. Saddik, M., Gamble, J., Witters, L. A., and Lopaschuk, G. D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25836-25845
52. Latipää, P. M., Hiltunen, J. K., Peuhkurinen, K. J., and Hassinen, I. E. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **752**, 162-171
53. Peuhkurinen, K. J., Nuutinen, E. M., Pietiläinen, E. P., Hiltunen, J. K., and Hassinen, I. E. (1982) *Biochem. J.* **208**, 577-581
54. Chance, E. M., Seeholzer, S. H., Kobayashi, K., and Williamson, J. R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13785-13794
55. Lewandowski, E. D. (1992) *Biochemistry* **31**, 8916-8923
56. Weiss, R. G., Chacko, V. P., Glickson, J. D., and Gerstenblith, G. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6426-6430
57. Cohen, D. M., and Bergman, R. N. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, E397-E409
58. Jeffrey, F. M. H., Diczku, V., Sherry, A. D., and Malloy, C. R. (1995) *Basic Res. Cardiol.* **90**, 388-396
59. Lin, R. C., and Davis, E. J. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 3867-3875
60. Ichihara, K., Neely, J. R., Siehl, D. L., and Morgan, H. E. (1980) *Am. J. Physiol.* **239**, E430-E436
61. Markovitz, L. J., Hasin, Y., Dann, E. J., Gotsman, M. S., and Freund, H. R. (1985) *J. Surg. Res.* **38**, 231-236
62. Jeffrey, F. M. H., Storey, C. J., Sherry, A. D., and Malloy, C. R. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, E788-E799
63. Lerch, R. (1993) *Basic Res. Cardiol.* **88**, 525-544
64. Prentki, M., and Corkey, B. E. (1996) *Diabetes* **45**, 273-273
65. Saha, A. K., Vavvas, D., Kurowski, T. G., Apazidis, A., Witters, L. A., Shafir, E., and Ruderman, N. B. (1997) *Am. J. Physiol.* **272**, E641-E648
66. Lopaschuk, G. D., and Gamble, J. (1994) *Can. J. Pharmacol.* **72**, 1101-1109
67. Comte, B., Vincent, G., Bouchard, B., and Des Rosiers, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26117-26124

Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts

MYRIAME POIRIER,¹ GENEVIÈVE VINCENT,¹ ANETA E. RESZKO,³
 BERTRAND BOUCHARD,² JOANNE K. KELLEHER,⁴
 HENRI BRUNENGRABER,³ AND CHRISTINE DES ROSIERS^{1,2}

¹Department of Biochemistry and ²Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Québec, Canada H3C 3J7; ³Department of Nutrition, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106-7139; and ⁴Department of Physiology, George Washington University, Medical Center, Washington, DC 20037-2337

Received 25 February 2002; accepted in final form 10 June 2002

Poirier, Myriame, Geneviève Vincent, Aneta E. Reszko, Bertrand Bouchard, Joanne K. Kelleher, Henri Brunengraber, and Christine Des Rosiers. Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1379–H1386, 2002. First published June 13, 2002; 10.1152/ajpheart.00244.2002.—Little is known about the sources of cytosolic acetyl-CoA used for the synthesis of malonyl-CoA, a key regulator of fatty acid oxidation in the heart. We tested the hypothesis that citrate provides acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis after its mitochondrial efflux and cleavage by cytosolic ATP-citrate lyase. We expanded on a previous study where we characterized citrate release from perfused rat hearts (Vincent G, Comte B, Poirier M, and Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846–E856, 2000). In the present study, we show that citrate release rates, ranging from 6 to 22 nmol/min, can support a net increase in malonyl-CoA concentrations induced by changes in substrate supply, at most 0.7 nmol/min. In experiments with [U-¹³C](lactate + pyruvate) and [1-¹³C]oleate, we show that the acetyl moiety of malonyl-CoA is derived from both pyruvate and long-chain fatty acids. This ¹³C-labeling of malonyl-CoA occurred without any changes in its concentration. Hydroxycitrate, an inhibitor of ATP-citrate lyase, prevents increases in malonyl-CoA concentrations and decreases its labeling from [U-¹³C](lactate + pyruvate). Our data support at least a partial role of citrate in the transfer from the mitochondria to cytosol of acetyl units for malonyl-CoA synthesis. In addition, they provide a dynamic picture of malonyl-CoA metabolism: even when the malonyl-CoA concentration remains constant, there appears to be a constant need to supply acetyl-CoA from various carbon sources, both carbohydrates and lipids, for malonyl-CoA synthesis.

gas chromatography-mass spectrometry; adenosine 5'-triphosphate-citrate lyase; hydroxycitrate; acetyl-coenzyme A; citric acid cycle; ¹³C-substrate; isotopomer analysis

THE INTRACELLULAR CONCENTRATION of malonyl-CoA modulates a number of physiological and pathophysiological

cal events. These effects of malonyl-CoA are related to its inhibition of carnitine palmitoyl transferase 1. The latter controls the entry of long-chain acyl-CoA into mitochondria, where they are β -oxidized for energy production. In addition, carnitine palmitoyl transferase 1 activity affects cytosolic concentrations of long-chain acyl-CoAs, which influence signal transduction and binding of nuclear transcription factors (5, 16, 19, 42). In lipogenic tissues such as the liver, malonyl-CoA is both a modulator of fatty acid oxidation and an intermediate of fatty acid synthesis (25). In nonlipogenic tissues such as the heart and skeletal muscle, cytosolic malonyl-CoA modulates fatty acid oxidation and is a component of a fuel-sensing and signaling mechanism that responds to changes in the cell's substrate supply and energy expenditure (31, 33). Recently, a dysregulated malonyl-CoA metabolism has been implicated in insulin resistance (33), apoptosis (19), and functional recovery of the heart after ischemia (20).

In the heart, the regulatory role of cytosolic malonyl-CoA is supported by the kinetic and regulatory properties of enzymes involved in its metabolism (13, 14, 20, 23, 33, 39). Malonyl-CoA is synthesized by the predominant 280-kDa isoform of acetyl-CoA carboxylase (ACC) or ACC β . This enzyme is regulated at the transcriptional and posttranslational levels, the latter via phosphorylation by 5'-AMP-activated protein kinase and protein kinase A. It is also activated by citrate and inhibited by long-chain acyl-CoA. Because tissue acetyl-CoA levels are lower than the K_m of ACC β for acetyl-CoA (117 μ M), the ACC β activity seems to be substrate driven. The only known fate of cardiac malonyl-CoA is recycling to acetyl-CoA via malonyl-CoA decarboxylase (MCD). Much less is known about the regulation of MCD compared with ACC β . Small variations in the energy demand of the heart could modulate MCD activity and results in rapid changes in malonyl-CoA levels (13, 17). It is unclear as to whether cardiac

Address for reprint requests and other correspondence: C. Des Rosiers, Laboratoire du Métabolisme Intermédiaire, Y-3616, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1 (E-mail: [redacted]).

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

MCD is regulated by phosphorylation as in the extensor digitorum longus muscle (14, 35).

Several issues regarding the proposed mechanism of fuel regulation by malonyl-CoA still remain unresolved. First, how can one explain that long-chain fatty acids (LCFA) are β -oxidized at an intracellular malonyl-CoA concentration that should inhibit completely the prevailing muscle isoform of carnitine palmitoyl transferase 1? Proposed explanations include malonyl-CoA protein binding and/or compartmentation (3, 13, 15, 18, 25). Second, how are cytosolic acetyl-CoA and malonyl-CoA levels correlated with fat and carbohydrate oxidation and the citric acid cycle (CAC) flux in mitochondria? Third, what is the source(s) of cytosolic acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis? One hypothesis is that acetyl-CoA generated by mitochondrial pyruvate dehydrogenase is channeled to carnitine acetyl transferase and translocase (2, 23, 24). A second hypothesis is that mitochondrial acetyl-CoA is transferred to the cytosol via citrate, the citrate transporter and cytosolic ATP-citrate lyase. The activities of enzymes involved in mitochondrial transfer of acetyl units via citrate or acetylcarnitine are small compared with the CAC flux rate (1, 4, 10, 27, 36). However, these activities could be sufficient to maintain the very small pool of malonyl-CoA (between 0.2 and 4 nmol/g wet wt) (4, 17, 20, 23, 37).

We previously demonstrated a modulation of mitochondrial citrate efflux in perfused rat hearts, reflected by rates of citrate release (40). In the present study, we examined the link between mitochondrial citrate synthesis/efflux and malonyl-CoA synthesis. To test the transport of acetyl units via citrate, we used hydroxycitrate, an inhibitor of ATP-citrate lyase (41). We also investigated the sources of the acetyl moiety of malonyl-CoA with [^{13}C]pyruvate and oleate by mass isotopomer analysis (8) to test the hypothesis of a preferential channeling of pyruvate-derived acetyl-CoA to malonyl-CoA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

The sources of chemicals, biological products, and ^{13}C -substrates have been identified previously (11, 12, 40).

[^3H]acetyl-CoA (25 $\mu\text{Ci}/\text{mol}$) was obtained from ICN (Montreal, Quebec, Canada). Hydroxycitrate (Citrin K; Garcinia Cambogia Extract Potassium Salt) was a generous gift from Dr. V. Badmaev of Sabinsa (Piscataway, NJ). The dialyzed albumin solution (13.4%, BSA fraction V, fatty acid poor, Bayer; Kankakee, IL) and the stock solution of 20 mM sodium oleate complexed to albumin were prepared and stored as described previously (40).

Heart Perfusions

Animal experimentation was approved by the local animal ethics committee in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Procedures for isolation and perfusion of rat hearts in the Langendorff mode have been described elsewhere (11, 12, 40). Briefly, the hearts of fed male Sprague-Dawley rats (180–210 g, Charles River Breeding Laboratories; St-Constant, Quebec, Canada) were perfused at a constant pressure of 70 mmHg with nonrecirculating modified Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) containing 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM NaHCO_3 , 5.5 mM glucose, and 8 nM insulin as well as other additives indicated below. The setup for continuous monitoring of functional parameters, using instruments linked to a microcomputer, has been described earlier (40). At the end of the experiments, the hearts were freeze clamped and stored in liquid nitrogen.

Perfusion Protocols

A two 30-min step protocol was designed to document the effect of selected metabolic perturbations that differentially affected the citrate release rate (40) on malonyl-CoA 1) net synthesis, as reflected by an increase in its tissue levels over 30 min; and 2) ^{13}C -labeling. All hearts underwent an initial 30-min perfusion with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate, and 0.05 mM pyruvate to ascertain that the tissue level of malonyl-CoA would be the same at the beginning of all metabolic interventions. One group of hearts was freeze clamped after 30 min. Parameters measured in effluent or tissue for this 0- to 30-min period served as baseline values. All other groups of hearts underwent an additional 30 min of perfusion before freeze clamping. In addition to the substrates listed in Table 1, the perfusion buffer contained 5 mM glucose and 8 nM insulin. The buffer composition for *protocol 1*, which served as a control, is that used for the baseline period. Buffer modifications for the 30- to 60-min period included an increase in the concentration of pyruvate from 0.05 to 0.5 mM, the addition of a fatty acid, either 0.4 mM oleate, a LCFA complexed to 4% albumin, or 0.2 mM octano-

Table 1. *Protocols of heart perfusion experiments*

| Protocol | Lactate, mM | Pyruvate, mM | Oleate, mM | Octanoate, mM | Other Additions |
|----------|-----------------------|------------------------|---------------------|---------------|--|
| 1 | 0.5 | 0.05 | | | |
| 1A | 0.5 $^{13}\text{C}_3$ | 0.05 $^{13}\text{C}_3$ | | | |
| 2 | 0.5 | 0.5 | | | |
| 3 | 1.0 | 0.2 | 0.4 | | 4% albumin, 50 μM carnitine |
| 3A | 1.0 $^{13}\text{C}_3$ | 0.2 $^{13}\text{C}_3$ | 0.4 ^{13}C | | 4% albumin, 50 μM carnitine |
| 4 | 1.0 | 0.2 | | 0.2 | |
| 5 | 0.5 | 0.05 | | | 1 mM hydroxycitrate |
| 5A | 0.5 $^{13}\text{C}_3$ | 0.05 $^{13}\text{C}_3$ | | | 1 mM hydroxycitrate |

All hearts underwent initial 30-min perfusion with nonrecirculating modified Krebs-Henseleit buffer containing 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 0.5 mM lactate, and 0.05 mM pyruvate. One group of hearts was quick frozen at 30 min. Parameters measured in effluent or tissue for this group served as baseline values. All other groups of hearts underwent an additional 30 min of perfusion (*protocols 1–5A*) with modifications of the substrates present in the buffer (except for *protocol 1*, which served as a control). In addition to the substrates listed, the perfusion buffer contained 5 mM glucose and 8 nM insulin.

ate, a medium-chain fatty acid, and the addition of 1 mM hydroxycitrate. Note that albumin was present only in the LCFA group. The ionized calcium and endogenous free fatty acid concentrations of the 4% albumin-containing buffer were determined to be 1.2 and 0.3 mM, respectively. The total free fatty acid concentration for the LCFA group was 0.7 mM. For protocols 1A, 3A, and 5A, the buffer composition was identical to that of protocols 1, 3, and 5, respectively, except that unlabeled lactate, pyruvate, and oleate were replaced with [$^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) and [^{13}C]oleate. For protocol 3A, [$^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) was present for the 0- to 60-min period and [^{13}C]oleate was present for the 30- to 60-min period. For protocols 1A and 5A, in which hearts were perfused in the absence or in the presence of 1 mM hydroxycitrate, respectively, [$^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) was present for the last 20 min of the 30- to 60-min time period. Thus for protocol 5A, hearts were perfused for 10 min in the presence of 1 mM hydroxycitrate to allow for ATP-citrate lyase inhibition before the addition of ^{13}C -substrates.

The following constraints were linked to the use of hydroxycitrate. First, hydroxycitrate was available as the potassium salt. The total potassium concentration in the perfusion buffer was maintained at 4.8 mM by lowering its potassium chloride content to 2.1 mM. Second, because hydroxycitrate is a calcium chelator (9), its addition to the perfusion buffer lowered the ionized calcium concentration from 0.94 ± 0.01 to 0.68 ± 0.01 mM ($P < 0.05$, $n = 9$, unpaired t -test), although it did not change the total calcium concentration (1.23 ± 0.03 mM, $n = 9$). Increasing the total calcium concentration of the buffer containing hydroxycitrate to 1.7 mM reestablished its ionized calcium concentration to 0.98 ± 0.02 mM ($n = 5$). Third, there was a background contamination by citrate in the hydroxycitrate solution (0.5% or 50 μM in a 1 mM solution) that prevented the assessment of citrate release rates.

Analytic Procedures

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methods for the determination of citrate release (40) and ^{13}C mass isotopomer distribution (MID) of tissue malonyl-CoA (32) have been described previously. Tissue malonyl-CoA levels were measured radioenzymatically using a modification of the procedure of McGarry and Brown (26). In brief, 0.05 g wet wt of powdered hearts was homogenized in 1 ml of 10% trichloroacetic acid, followed by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min at 4°C. Pellets were kept for protein determination by the Bradford method (6). Supernatants were washed six times with 1 ml of ether, dried in a Speed-Vac, and stored at -80°C. The incubation mixture for malonyl-CoA assay (final volume 1 ml) contained 50 μl lyophilized extract (resuspended in 1 M potassium phosphate buffer-10 mM EDTA (pH 7.1)), 200 μmol potassium phosphate buffer (pH 7.1), 2 μmol EDTA, 2.5 μmol dithiothreitol, 0.2 μmol NADPH, 1 mg BSA, 0.75 nmol [^3H]acetyl-CoA (0.9 $\mu\text{Ci/nmol}$), and 5 mU rat liver fatty acid synthase (21). All assays were calibrated by spiking duplicate samples with 0.0625 nmol malonyl-CoA. We verified the linearity of the assay with tissue weights in the range of 0.05–0.1 g wet wt. Analyses of total and ionized calcium levels in perfusion buffer samples were conducted by the Clinical Biochemistry Laboratory of Notre-Dame Hospital.

Calculations, Data Presentation, and Statistical Analyses

^{13}C -labeling of metabolites. Mass isotopomers of malonyl-CoA containing 1 and 2 ^{13}C atoms are identified as M_1 with i

= 1 and 2. The absolute molar percent enrichment (MPE) of a given mass isotopomer M_i was calculated as follows

$$\text{MPE}(M_i) = \text{Percent } A_{M_i} / [A_M + \sum A_{M_i}] \quad (1)$$

where A_M and A_{M_i} represent the peak areas from GC ion chromatograms corrected for natural abundance, corresponding to unlabeled (M) and ^{13}C -labeled (M_i) mass isotopomers, respectively.

Data are expressed as means \pm SE for n heart perfusions. As an index of the contractile activity of the heart, we report only dP/dt_{max} values, which were constant and hence averaged for a given 30-min period. Statistical analyses were conducted by either paired t -test (dP/dt_{max} and citrate release), unpaired t -test (^{13}C -labeling of malonyl-CoA), one-way ANOVA followed by a Bonferroni multiple-comparison posttest (tissue citrate levels), or nonparametric Kruskal-Wallis one-way ANOVA followed by Dunn's multiple-comparison test (tissue malonyl-CoA levels). We tested for differences between values obtained for hearts perfused during the 30- to 60-min period to those obtained during the 0- to 30-min baseline period and for the effect of hydroxycitrate. A probability of $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Cardiac Contractile Parameters

In the baseline period, perfused hearts maintained a constant spontaneous beating at 309 ± 5 beats/min, a coronary flow rate of 11 ± 1 ml/min, a left ventricular developed pressure of 113 ± 2 mmHg, a rate-pressure product of $(34.9 \pm 0.8) \times 10^{-3}$ mmHg·beats·min $^{-1}$ (not shown), and a dP/dt_{max} of $3,267 \pm 167$ mmHg/s (Fig. 1, left). Compared with the baseline period (0–30 min), the contractile activity (dP/dt_{max}) decreased in the 30- to 60-min period in all groups except in hearts perfused

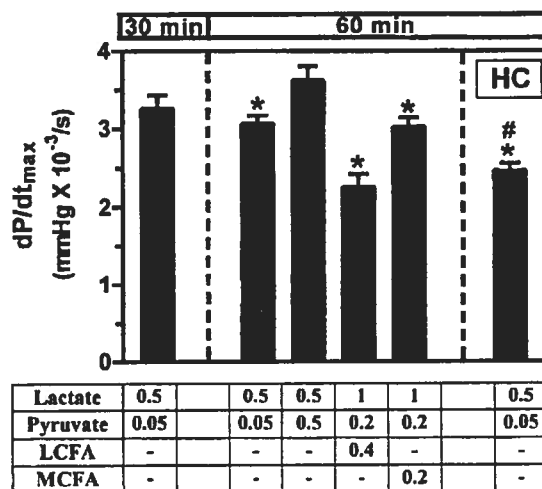


Fig. 1. Contractile activity (dP/dt_{max}) of hearts perfused with various substrate mixtures and hydroxycitrate (HC). Data shown are means \pm SE for 5–11 experiments. Hearts were perfused for 30 (left) and 60 min with 5 mM glucose, 8 nM insulin, and with other substrates, as indicated (middle), in the absence or in the presence of 1 mM HC (right). Values for dP/dt_{max} were averaged for the 15- to 30- and 45- to 60-min periods. * $P \leq 0.05$, all data at 30–60 min versus those at 0–30 min; # $P < 0.05$, effect of HC: values compared with control for the 30- to 60-min period. MCFA and LCFA, medium- and long-chain fatty acid, respectively.

with 0.5 mM pyruvate (Fig. 1, *middle*). Hydroxycitrate addition to control hearts resulted in a 20% decline of dP/dt_{max} values (Fig. 1, *right*). This effect of hydroxycitrate was not due to calcium chelation (9), because it was also observed after normalization of the buffer concentration of ionized calcium (not shown). Changes in dP/dt_{max} values paralleled those of the left ventricular developed pressure and of the rate-pressure product, whereas values of coronary flow rate and heart rate remained similar to the baseline values (not shown).

Citrate Efflux and Malonyl-CoA Concentrations

Under all conditions, citrate release rates were constant for a given 30-min period, ranging from 7 to 22 nmol/min. In control hearts, citrate release rates (Fig. 2A) and tissue levels (Fig. 2B) were the same in the 30- to 60-min period than in the baseline period. Increasing pyruvate concentration from 0.05 to 0.5 mM, or adding octanoate or oleate to the perfusion buffer during the 30- to 60-min period, increased citrate release rates and tissue citrate levels in parallel. A similar correlation between citrate release rates and tissue levels was observed in our previous study in normoxic Langendorff-perfused rat hearts (40), although not in the swine heart *in vivo* (28).

In hearts perfused under control conditions and in those perfused with 0.5 mM pyruvate, malonyl-CoA levels were similarly increased by 30% at 60 min compared with 30 min (Fig. 2C), reflecting net malonyl-CoA synthesis. Malonyl-CoA levels were not increased in the presence of oleate but markedly increased in the presence of octanoate, in agreement with recent data from Longnus et al. (22).

Addition of hydroxycitrate did not modify tissue citrate levels (Fig. 3A). However, it prevented the increase in tissue malonyl-CoA levels during the 30- to 60-min period (Fig. 3B). This effect was not observed in perfusions with 1 mM citrate (not shown).

Sources of Acetyl Moiety for Malonyl-CoA Synthesis

We recently developed a technique to assess the ^{13}C MID of malonyl-CoA (32). With the use of this technique, we probed the origin of the acetyl moiety of malonyl-CoA using $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate) and $[1-^{13}C]$ oleate in the same perfusion experiments (*protocol 3A*). Decarboxylation of $[U-^{13}C_3]$ pyruvate forms M2 isotopomers of acetyl-CoA and malonyl-CoA, whereas $[1-^{13}C]$ oleate oxidation forms M1 isotopomers. Note that in these nonrecirculating perfusions with 25 mM bicarbonate buffer, the incorporation of $^{13}CO_2$ derived from the oxidation of the ^{13}C -substrates is negligible. This is demonstrated by the absence of the M3 isotopomer of malonyl-CoA.

In hearts perfused with $[U-^{13}C_3]$ (lactate + pyruvate) and $[1-^{13}C]$ oleate, malonyl-CoA was enriched in both M1 and M2 isotopomers (Fig. 4A). From these M2 and M1 enrichment values, one can estimate the percentage of malonyl-CoA molecules that arose from acetyl-CoA generated by pyruvate decarboxylation and oleate

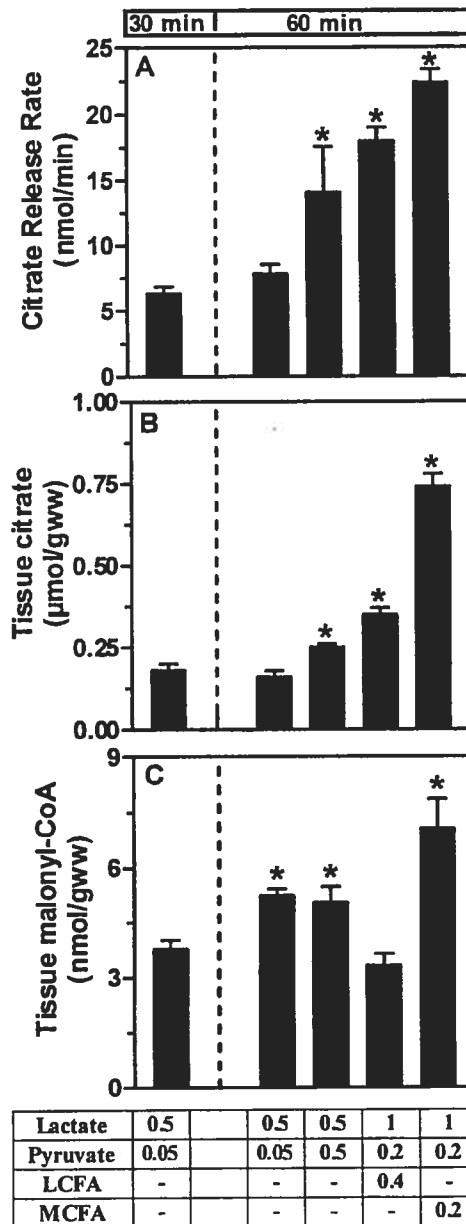


Fig. 2. Citrate release rates (A) and tissue levels of citrate (B) and of malonyl-CoA (C) of hearts perfused with various substrate mixtures. Data shown are means \pm SE for 5–11 experiments. Hearts were perfused for 30 (*left*) and 60 min with 5 mM glucose, 8 nM insulin, and other substrates (*right*), as indicated below. Citrate release rates were averaged for the 15- to 30- and 45- to 60-min periods. * $P \leq 0.05$, all data at 30–60 min versus those at 0–30 min. gww, Grams wet weight.

oxidation, respectively, following a reasoning similar to that used previously for estimating the relative contribution of these pathways to the acetyl moiety of citrate (cf. Eqs. 5 and 6 of Ref. 11, respectively). Note that this calculation does not require any corrections for recycling of $[^{13}C]$ citrate isotopomers in the TCA cycle, but it is subject to some uncertainties because it assumes the existence of only one pool of malonyl-CoA (3, 13, 15, 18).

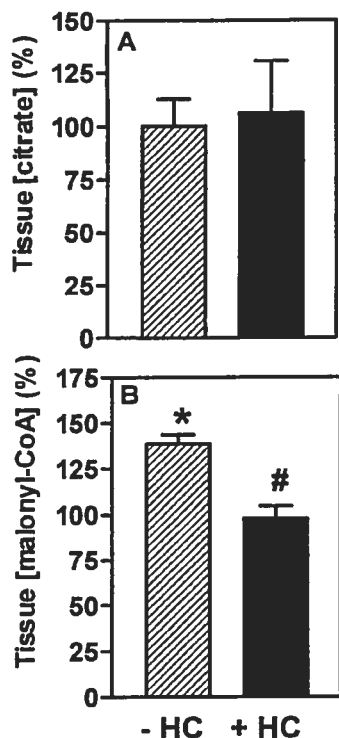


Fig. 3. Effect of HC on tissue levels of citrate (A) and malonyl-CoA (B) in perfused hearts. Data shown are means \pm SE of 4 and 7 experiments with 5.5 mM glucose, 0.5 mM [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]lactate, and 0.05 mM [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$]pyruvate in the absence (control conditions; -HC) or in the presence of 1 mM HC, respectively. The data, obtained during the 30- to 60-min period, are expressed as percentages of corresponding baseline data obtained for hearts perfused under control conditions during the 0- to 30-min period. * $P < 0.05$, all data at 30-60 min versus those at 0-30 min; # $P < 0.05$, effect of HC: values compared with control for the 30- to 60-min period.

From the M2 enrichment of malonyl-CoA (9.9%), one can calculate a 10% contribution of exogenous pyruvate decarboxylation to the acetyl moiety of malonyl-CoA. To calculate the contribution of exogenous fatty acid oxidation, one has to consider two factors: 1) only one of nine acetyl units of the oleate molecule was labeled with ^{13}C , and 2) the albumin preparation contained 0.3 mM unlabeled free fatty acids, which must be added to the 0.4 mM concentration of [$1\text{-}^{13}\text{C}$]oleate. Therefore, the contribution of exogenous fatty acids to the acetyl moiety of malonyl-CoA was obtained by multiplying the M1 enrichment of malonyl-CoA (5.8%) by $[9 \times (0.4 + 0.3)/0.4]$, yielding 91%. Note that this value of 91% probably overestimates slightly the true contribution of exogenous fatty acids to malonyl-CoA because some unlabeled free fatty acids in the albumin preparation could have less than nine acetyl units (e.g., palmitate).

We also tested the effect of hydroxycitrate on malonyl-CoA labeling from [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) (protocols 1A and 5A). Hydroxycitrate decreased slightly (22%), but significantly, the M2 enrichment of malonyl-CoA (Fig. 4B).

DISCUSSION

The goal of the present study was to shed some light on the sources of the acetyl moiety of cytosolic malonyl-CoA in the heart. There are two possible pathways for transferring acetyl units from mitochondria to the cytosol: 1) citrate transporter and ATP-citrate lyase and 2) carnitine acetyl translocase and transferase (Fig. 5). The activities of enzymes involved in the two putative processes, albeit low (1, 4, 10, 27, 36), seem sufficient to maintain the very small pool of malonyl-CoA in the heart. We decided to investigate first the citrate pathway because our previous study (40) had identified a sizeable citrate efflux from the perfused rat heart (5-25 nmol/min). This efflux of citrate amounts to 0.2-1% of CAC flux and is modulated by the nature of the substrates offered to the heart and by energy demand.

In the present study, we confirmed the relationship between citrate release rates and tissue content (40) (Fig. 2, A and B). In addition, we compared changes in citrate release and in malonyl-CoA tissue levels induced by modifications of substrate supply (Fig. 2, B and C). No correlation was found, but citrate release rates were far in excess of increases in malonyl-CoA content based on the following. Malonyl-CoA concentrations were measured 30 min after changing the substrate profile in the perfusate. Most likely, the various substrate mixtures affected differentially the supply of substrate (acetyl-CoA) and/or the levels of allosteric regulators of ACC_β (citrate and long-chain acyl-CoA). Malonyl-CoA accumulation over time could have resulted from an increased substrate flux through ACC_β with no change or a decrease in flux through MCD. We do not know the time course of these changes, but it is likely to have been fairly rapid (4, 13, 17, 23, 37). Because the half-life of malonyl-CoA in similarly perfused rat hearts is ~ 1.5 min (32), let us assume that the changes in malonyl-CoA concentrations occurred over 5 min. The net rate of malonyl-CoA accumulation would then be 0.2-0.7 nmol \cdot min $^{-1}\cdot$ g

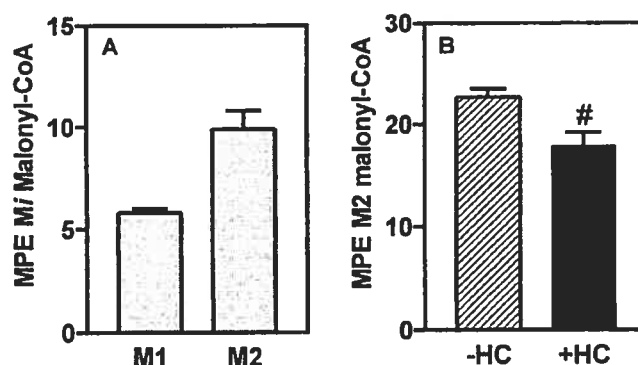


Fig. 4. ^{13}C -labeling of tissue malonyl-CoA in hearts perfused with ^{13}C -substrates. Data are expressed as molar percent enrichments (MPE) and are means \pm SE of 4-8 experiments. After perfusion under baseline conditions, hearts were perfused with [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) and [$1\text{-}^{13}\text{C}$]oleate from 30 to 60 min (protocol 3A) (A) or [$U\text{-}^{13}\text{C}_3$](lactate + pyruvate) from 40 to 60 min (protocols 1A and 5A) (B). In protocol 5A, HC was present at 1 mM for the 30- to 60-min period. # $P < 0.05$, effect of HC.

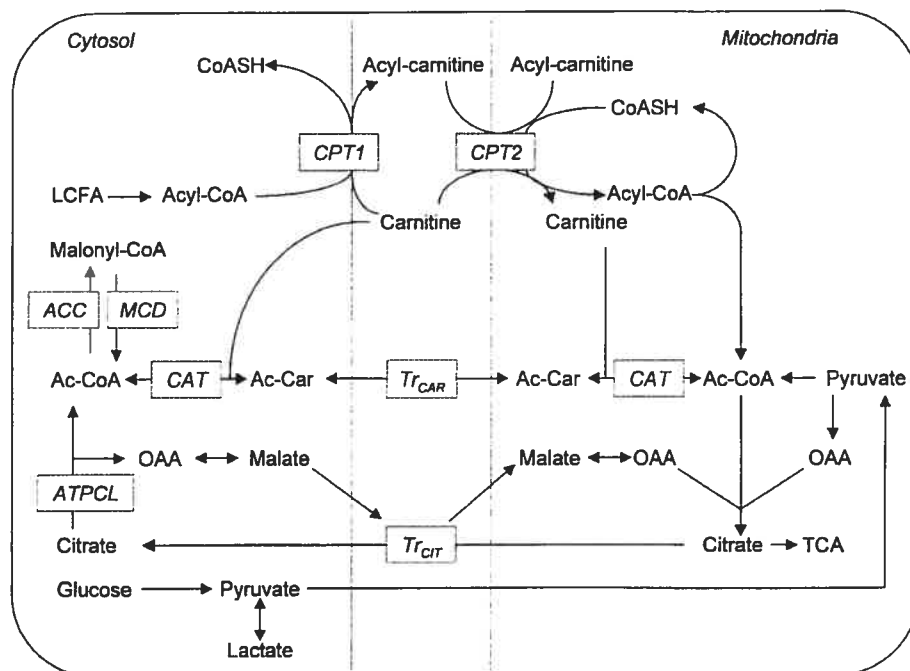


Fig. 5. Scheme of the putative mechanisms that transfer mitochondrial acetyl units to the cytosolic site of malonyl-CoA synthesis in the heart. Enzymes: ATPCL, ATP-citrate lyase; CAT, carnitine acetyl/acetyl transferase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CAC, citric acid cycle; Tr_{CAR} , carnitine acetyl translocase; Tr_{CIT} , mitochondrial tricarboxylate transporter. Metabolites: Ac-CoA, acetyl-CoA; Ac-Car, acetylcarnitine; OAA, oxaloacetate.

wet wt⁻¹. This compares to citrate release rates ranging from 7 to 22 nmol/min. Note that citrate release rates represent the difference between citrate efflux from mitochondria and citrate disposal via cytosolic ATP-citrate lyase. These observations are compatible with citrate being involved in the transfer of acetyl units.

We used hydroxycitrate, an inhibitor of ATP-citrate lyase (41), to further test the participation of the citrate pathway in the heart. Saha et al. (34) have shown a decrease in malonyl-CoA concentrations in rat muscle incubated in the presence of hydroxycitrate. In our study, the addition of 1 mM hydroxycitrate to the perfusate prevented the increase in malonyl-CoA concentration over baseline levels (Fig. 3B). This effect was observed despite 1) a lowering of the contractile activity of the heart, a condition that could potentially increase the activity of ACC_{β} and/or decrease that of MCD (17, 33); and 2) the known capacity of hydroxycitrate to act as an allosteric activator of ACC_{β} (34). In fact, each of these two factors should have favored an increase, rather than a decrease, in tissue malonyl-CoA levels. These observations are also compatible with the participation of cytosolic ATP-citrate lyase in the generation of acetyl-CoA for malonyl-CoA synthesis.

Additional arguments for the citrate pathway were obtained from experiments with ¹³C-labeled substrates. First, in perfusions with [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) and [1-¹³C]oleate, we showed that acetyl units used for malonyl-CoA synthesis are generated from both decarboxylation of exogenous pyruvate/lactate and β -oxidation of exogenous LCFA. The relative contributions of these two processes to malonyl-CoA formation (10% and 90%) are similar to those reported

for the acetyl moiety of citrate in rat hearts perfused under similar conditions (40). Despite some uncertainties in the calculation of these estimates, these data argue against a preferential channeling of pyruvate-derived acetyl-CoA to malonyl-CoA via acetylcarnitine transferase/translocase (2, 23, 24). In studies conducted by Lysiak et al. (24) in isolated rat heart mitochondria, the formation of acetylcarnitine from pyruvate was favored by low concentrations of catalytic intermediates of the CAC. Thus, in the presence of high carnitine concentration, the formation of acetylcarnitine had to be the major fate of acetyl-CoA derived from pyruvate decarboxylation. Furthermore, the decrease in acetylcarnitine formation upon addition of malate is probably explained by the incorporation of acetyl groups into citrate. In the present study, the mix of substrates provided (some of them anaplerotic) presumably insured adequate constant concentrations of CAC intermediates as reflected by a sizeable citrate efflux.

Hydroxycitrate prevented the increase in tissue malonyl-CoA levels and lowered the extent of ¹³C-labeling of malonyl-CoA from [U-¹³C₃](lactate + pyruvate). Thus, despite the presence of 1 mM hydroxycitrate, some acetyl units derived from [U-¹³C₃](lactate + pyruvate) were converted to malonyl-CoA. These data can be interpreted in two ways. First, the concentration of hydroxycitrate (1 mM) might not have been sufficient to fully inhibit ATP-citrate lyase. Hydroxycitrate, a tri-anion at physiological pH, does not permeate easily through cell membranes. This is why the concentration of malonyl-CoA in incubating muscle (34) decreased as hydroxycitrate concentrations were raised from 1 to 4 mM. This also explains why the K_i for hydroxycitrate of isolated ATP-citrate lyase (0.05–

0.6 μ M) (38, 41) is three to four orders of magnitude lower than the concentration of hydroxycitrate required to inhibit fatty acid synthesis by 50% in the intact liver (2 mM) (7). Second, it is possible that the citrate-cleavage pathway and the acetylcarnitine transferase/translocase pathway both contribute to the acetyl moiety of malonyl-CoA, at least under some circumstances.

In conclusion, our data support the role of citrate in the transfer of acetyl units from the mitochondria to cytosol in the heart. Results from this and our previous study (32) show that measurements of malonyl-CoA concentrations and related enzyme activities provide only a partial picture of malonyl-CoA metabolism. Cycling between acetyl-CoA and malonyl-CoA does not change the malonyl-CoA concentration in the heart, where the only known fate of malonyl-CoA is degradation to acetyl-CoA. However, cytosolic acetyl-CoA might be hydrolyzed to acetate as occurs in numerous organs (30) or converted to acetylcarnitine before export. Thus, although the low level of malonyl-CoA in cytosol remains fairly constant, there is probably a constant need to supply acetyl-CoA to ACC β . This study with 13 C-substrates provides a dynamic picture of the carbon sources and fluxes leading to malonyl-CoA even when its concentration does not change. Results from this study do not exclude, however, a contribution of the acetylcarnitine pathway in the transfer of acetyl units from the mitochondria to cytosol. The citrate and the acetylcarnitine pathways might coexist and ensure a constant supply of acetyl-CoA to ACC β under various conditions. One factor that could determine the contributions of the two pathways could be the relative availability of anaplerotic substrates versus acetyl-CoA and carnitine in mitochondria. Another potential factor is the regulation of ATP-citrate lyase activity by covalent modification (29). Further studies will investigate the respective roles of citrate and acetylcarnitine pathways to the supply of acetyl moiety of malonyl-CoA.

The authors thank Dr. Marc Prentki and Laura Segall for assisting in setting up the malonyl-CoA assay and Drs. John Chatham, Blandine Comte, and Hans Kornberg for helpful comments.

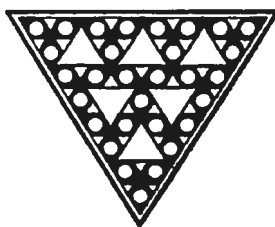
The study was supported by the Canadian Institutes for Health Research Grants MT-9575 and MT-10920 (to C. Des Rosiers and a studentship to G. Vincent).

Part of this work was presented at the 1999 and 2001 meetings of Experimental Biology.

REFERENCES

1. Abbas AS, Wu G, and Schulz H. Carnitine acetyltransferase is not a cytosolic enzyme in rat heart and therefore cannot function in the energy-linked regulation of cardiac fatty acid oxidation. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1305–1309, 1998.
2. Abdel-aleem S, Nada MA, Sayed-Ahmed M, Hendrickson SC, St Louis J, Walthall HP, and Lowe JE. Regulation of fatty acid oxidation by acetyl-CoA generated from glucose utilization in isolated myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 28: 825–833, 1996.
3. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, and Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1444–1449, 2000.
4. Awan MM and Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes and its relevance to the control of fatty acid oxidation. *Biochem J* 295: 61–66, 1993.
5. Barger PM and Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 10: 238–245, 2000.
6. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
7. Brunengraber H, Boutry M, and Lowenstein JM. Fatty acid, 3- β -hydroxysterol, and ketone synthesis in the perfused rat liver. Effects of (-)-hydroxycitrate and oleate. *Eur J Biochem* 82: 373–384, 1978.
8. Brunengraber H, Kelleher JK, and Des Rosiers C. Applications of mass isotopomer analysis to nutrition research. *Annu Rev Nutr* 17: 559–596, 1997.
9. Cheema-Dhadli S, Halperin ML, and Leznoff CC. Inhibition of enzymes which interact with citrate by (-)-hydroxycitrate and 1,2,3-tricarboxybenzene. *Eur J Biochem* 38: 98–102, 1973.
10. Cheema-Dhadli S, Robinson BH, and Halperin ML. Properties of the citrate transporter in rat heart: implications for regulation of glycolysis by cytosolic citrate. *Can J Biochem* 54: 561–565, 1976.
11. Comte B, Vincent G, Bouchard B, and Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the 13 C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117–26124, 1997.
12. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Jette M, Cordeau S, and Des Rosiers C. A 13 C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125–26131, 1997.
13. Dyck JRB, Barr AJ, Barr RL, Kolattukudy PE, and Lopaschuk GD. Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H2122–H2129, 1998.
14. Dyck JRB, Kudo N, Barr AJ, Davies SP, Hardie DG, and Lopaschuk GD. Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. *Eur J Biochem* 262: 184–190, 1999.
15. Eaton S, Fukumoto K, Paladio DNN, Pierro A, Spitz L, Quant PA, and Bartlett K. Carnitine palmitoyl transferase I and the control of myocardial beta-oxidation flux. *Biochem Soc Trans* 29: 245–250, 2001.
16. Faergeman NJ and Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 323: 1–12, 1997.
17. Goodwin GW and Taegtmeier H. Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277: E772–E777, 1999.
18. Hamilton C and Saggerson ED. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J* 350: 61–67, 2000.
19. Hickson-Bick DLM, Buja LM, and McMillin JB. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32: 511–519, 2000.
20. Kantor PF, Dyck JR, and Lopaschuk GD. Fatty acid oxidation in the reperfused ischemic heart. *Am J Med Sci* 318: 3–14, 1999.
21. Linn TC. Purification and crystallization of rat liver fatty acid synthetase. *Arch Biochem Biophys* 209: 613–619, 1981.
22. Longnus SL, Wambolt RB, Barr RL, Lopaschuk GD, and Allard MF. Regulation of myocardial fatty acid oxidation by substrate supply. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1561–H1567, 2001.
23. Lopaschuk GD and Gamble J. Acetyl-CoA carboxylase: an important regulator of fatty acid oxidation in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1101–1109, 1994.
24. Lysiak W, Toth PP, Suelter CH, and Bieber LL. Quantitation of the efflux of acylcarnitines from rat heart, brain, and liver mitochondria. *J Biol Chem* 261: 13698–13703, 1986.
25. McGarry JD and Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244: 1–14, 1997.

26. McGarry JD, Stark MJ, and Foster DW. Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J Biol Chem* 253: 8291–8293, 1978.
27. Nuutinen EM, Peuhkurinen KJ, Pietilainen EP, Hiltunen JK, and Hassinen IE. Elimination and replenishment of tricarboxylic acid-cycle intermediates in myocardium. *Biochem J* 194: 867–875, 1981.
28. Panchal AR, Comte B, Huang H, Kerwin T, Darvish A, Des Rosiers C, Brunengraber H, and Stanley WC. Partitioning of pyruvate between oxidation and anaplerosis in swine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2390–H2398, 2000.
29. Potapova IA, El-Maghrabi MR, Doronin SV, and Benjamin WB. Phosphorylation of recombinant human ATP:citrate lyase by cAMP-dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity. Allosteric activation of ATP:citrate lyase by phosphorylated sugars. *Biochemistry* 39: 1169–1179, 2000.
30. Prass RL, Isohashi F, and Utter MF. Purification and characterization of an extramitochondrial acetyl coenzyme A hydrolyase from rat liver. *J Biol Chem* 255: 5215–5223, 1980.
31. Prentki M and Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45: 273–283, 1996.
32. Reszko AE, Kasumov T, Comte B, Pierce BA, David F, Bederman IR, Deutsch J, Des Rosiers C, and Brunengraber H. Assay of the concentration and ¹³C-isotopic enrichment of malonyl-coenzyme A by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 298: 69–75, 2001.
33. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, and Witters LA. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E1–E18, 1999.
34. Saha AK, Laybutt DR, Dean D, Vavvas D, Sebokova E, Ellis B, Klimes I, Kraegen EW, Shafir E, and Ruderman NB. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276: E1030–E1037, 1999.
35. Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tornheim K, Prentki M, and Ruderman NB. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside. *J Biol Chem* 275: 24279–24283, 2000.
36. Sluse FE, Meijer AJ, and Tager JM. Anion translocators in rat heart mitochondria. *FEBS Lett* 18: 148–153, 1971.
37. Stanley WC, Hernandez LA, Spires D, Bringas J, Wallace S, and McCormack JG. Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: effects of dichloroacetate. *J Mol Cell Cardiol* 28: 905–914, 1996.
38. Sullivan AC, Singh M, Srere PA, and Glusker JP. Reactivity and inhibitor potential of hydroxycitrate isomers with citrate synthase, citrate lyase, and ATP citrate lyase. *J Biol Chem* 252: 7583–7590, 1977.
39. Thampy KG. Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J Biol Chem* 264: 17631–17634, 1989.
40. Vincent G, Comte B, Poirier M, and Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846–E856, 2000.
41. Watson JA, Fang M, and Lowenstein JM. Tricarballylate and hydroxycitrate: substrate and inhibitor of ATP:citrate oxaloacetate lyase. *Arch Biochem Biophys* 135: 209–217, 1969.
42. Zammit VA. The malonyl-CoA long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem J* 343: 505–515, 1999.



Reverse flux through cardiac NADP⁺-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia

BLANDINE COMTE,¹ GENEVIÈVE VINCENT,² BERTRAND BOUCHARD,¹
MOHAMED BENDERDOUR,¹ AND CHRISTINE DES ROSIERS^{1,2}

Departments of ¹Nutrition and ²Biochemistry, University
of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Received 1 April 2002; accepted in final form 30 May 2002

Comte, Blandine, Geneviève Vincent, Bertrand Bouchard, Mohamed Benderdour, and Christine Des Rosiers. Reverse flux through cardiac NADP⁺-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1505–H1514, 2002. First published June 6, 2002; 10.1152/ajpheart.00287.2002.—Little is known about the role of mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) in the heart, where this enzyme shows its highest expression and activity. We tested the hypothesis that in the heart, NADP⁺-ICDH operates in the reverse direction of the citric acid cycle (CAC) and thereby may contribute to the fine regulation of CAC activity (Sazanov and Jackson, *FEBS Lett* 344: 109–116, 1994). We documented a reverse flux through this enzyme in rat hearts perfused with the medium-chain fatty acid octanoate using [U-¹³C₆]glutamate and mass isotopomer analysis of tissue citrate (Comte et al., *J Biol Chem* 272: 26117–26124, 1997). In this study, we assessed the significance of our previous finding by perfusing hearts with long-chain fatty acids and tested the effects of changes in O₂ supply. We showed that under all of these conditions citrate was enriched in an isotopomer containing five ¹³C atoms. This isotopomer can only be explained by substrate flux through reversal of the NADP⁺-ICDH reaction, which is evaluated at 3–7% of flux through citrate synthase. Small variations in reversal fluxes induced by low-flow ischemia that mimicked hibernation occurred despite major changes in contractile function and O₂ consumption of the heart as well as citrate and succinate release rates and tissue levels. Our data show a reverse flux through NADP⁺-ICDH and support its hypothesized role in the fine regulation of CAC activity in the normoxic and O₂-deprived heart.

citric acid cycle; citrate release; isotopomer analysis; ¹³C substrate; anaplerosis

CARDIAC ISCHEMIC DISEASES have been associated with chronic alterations of energy metabolism such as increased myocardial citrate release (24, 42). The cause of this deregulated cardiac citrate metabolism is unclear. Myocardial citrate release reflects its efflux from mitochondria (43) where it is synthesized by citrate synthase during normal operation of the citric acid

cycle (CAC; Fig. 1). Citrate release, which is modulated by substrates and/or O₂ supply (24, 28, 29, 43), represents at most 1% of CAC flux. Mitochondrial citrate efflux appears normally to be compensated largely by flux through anaplerotic reactions such as pyruvate carboxylation, which represents between 2 and 8% of CAC flux (5, 28, 29).

Citrate synthesis could also occur through a reductive process, which involves the participation of the CAC enzymes aconitase and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH). Aconitase catalyzes the reversible interconversion between citrate and isocitrate. Its activity is modulated by oxidative stress (3, 25). NADP⁺-ICDH catalyzes the reversible interconversion between isocitrate and α-ketoglutarate (α-KG). It has no known allosteric effector. This is in contrast with NAD⁺-ICDH, which has kinetic properties that are consistent with its unidirectional operation in vivo toward α-KG formation. The latter enzyme is highly regulated by a variety of positive (Ca²⁺, ADP, and citrate) and negative (ATP, NADH, and NADPH) effectors (10).

Little is known about mitochondrial NADP⁺-ICDH in the heart. It is unclear whether this enzyme operates in the forward direction of the CAC cycle, generating α-KG and NADPH, or in the reverse direction, generating isocitrate and NADP⁺. For livers perfused under normoxia, we estimated (7) that 45% of total citrate formation occurs through the reversal of NADP⁺-ICDH and aconitase reactions. Investigating the reverse flux of NADP⁺-ICDH in the heart appears to be even more relevant than in the liver for many reasons. First, NADP⁺-ICDH shows its highest activity and mRNA expression in the heart (19, 20). Second, according to Thomassen et al. (42), reverse flux through NADP⁺-ICDH may participate in the formation of citrate from glutamate and hence possibly explains the higher myocardial citrate release in cardiac patients. Third, according to Sazanov and Jackson (35), reverse flux through mitochondrial NADP⁺-ICDH could be part of a substrate cycle that contributes to fine regulation of CAC activity, thereby providing en-

Address for reprint requests and other correspondence: C. Des Rosiers, Laboratoire du Métabolisme Intermédiaire, Y-3616, Centre hospitalier de l'Université de Montréal-Hôpital Notre-Dame, 1560 rue Sherbrooke Est, Montréal, QC, Canada, H2L 4M1 (E-mail: rosiers@pharm.umontreal.ca).

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

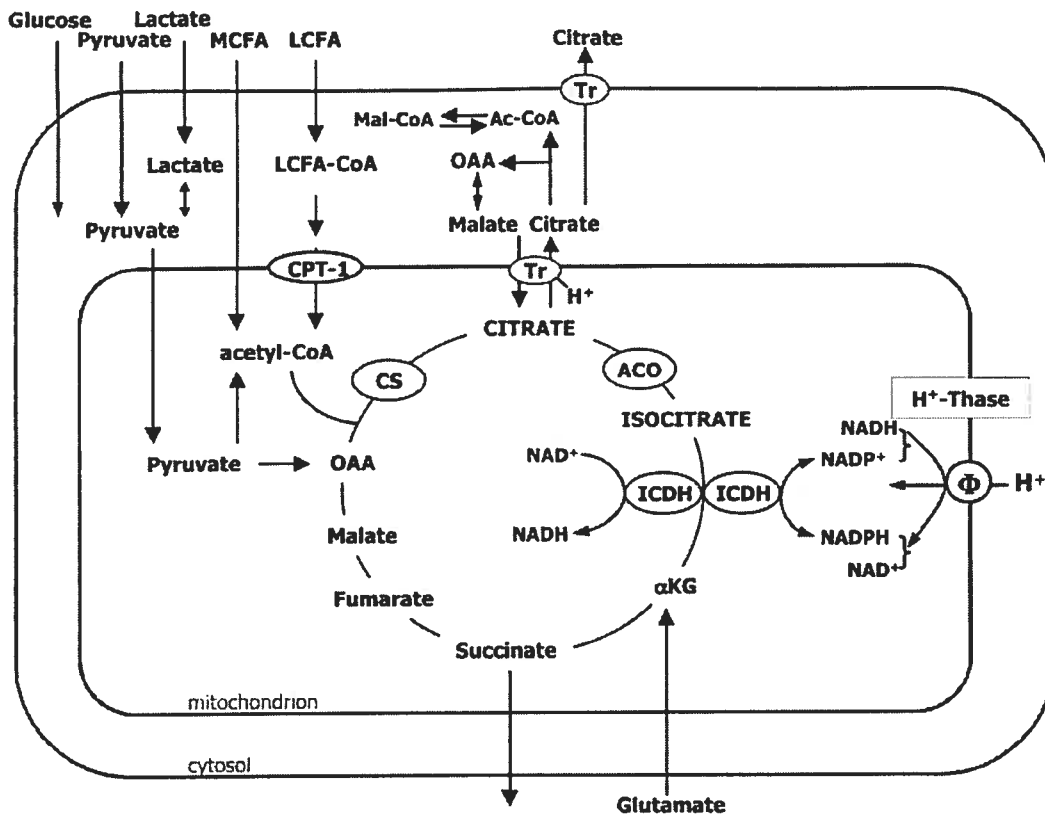


Fig. 1. Scheme integrating the participation of mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase (NADP⁺-ICDH) and H⁺-transhydrogenases (H⁺-Thase) in substrate metabolism in the heart. MCFA, LCFA, medium- and long-chain fatty acids, respectively; Mal-CoA, malonyl-CoA; Ac-CoA, acetyl-CoA; Tr, transporter; ACO, aconitase; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase 1; CS, citrate synthase; OAA, oxaloacetate; Φ , transmembrane potential gradient; α -KG, α -ketoglutarate.

hanced sensitivity to changes in energy demand. This cycle also includes the participation of NAD⁺-ICDH and H⁺ transhydrogenases to regenerate α -KG and NADPH, respectively (Fig. 1). That NADP⁺-ICDH could operate *in vivo* in the reverse direction is supported by its kinetic properties in terms of the Michaelis-Menten constant (K_m) and available information on its substrate concentrations in the matrix of isolated mitochondria as well as its thermodynamic parameters (33, 35, 44). Finally, Jo et al. (14) recently presented evidence from a NIH3T3 cell line that NADP⁺-ICDH could function as an antioxidant defense enzyme. This role requires, however, that NADP⁺-ICDH operates in the forward direction of the CAC to form NADPH for regenerating reduced glutathione by glutathione reductase.

The objective of this study was to investigate substrate flux through the reversal of NADP⁺-ICDH in the intact heart. We expanded on a previous study (4) where we documented this reverse flux in rat hearts perfused under normoxia with the medium-chain fatty acid (MCFA) octanoate and physiological concentrations of glucose, lactate, pyruvate, and glutamate. This was achieved using the ¹³C protocol developed for perfused rat livers (7). In the current study, we assessed

the physiological significance of our previous finding by perfusing hearts in the presence of the physiological long-chain fatty acid (LCFA) oleate. In addition, we tested the effects of O₂ deprivation, a condition for which Sazanov and Jackson's hypothesis (35) predicts increased reverse flux through NADP⁺-ICDH. Flux values were extrapolated from the ¹³C mass isotopomer distribution (MID) of tissue citrate and α -KG levels, which were assessed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The mechanical and metabolic responses of the heart were documented under all conditions through various measurements: 1) indices of the heart's contractile activity, 2) release rates and tissue concentrations of CAC intermediates, and 3) activity of the tissue CAC enzymes citrate synthase, aconitase, NAD⁺-ICDH, and NADP⁺-ICDH.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals

The sources of chemicals, biological products, and ¹³C substrates have been identified previously (5, 43). The dialyzed 13.4% albumin solution (BSA fraction V, fatty acid poor; Bayer) and the stock solution of 20 mM sodium oleate

complexed to albumin were prepared and stored as described previously (43).

Heart Perfusions

Animal experiments were approved by the local animal ethics committee in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Procedures for the isolation and perfusion of rat hearts in the Langendorff mode have been described elsewhere (5, 16, 43). Briefly, the hearts of fed male Sprague-Dawley rats (body wt 160–200 g; Charles River Breeding Laboratories) were perfused for 15–20 min at a constant pressure of 70 mmHg with nonrecirculating modified Krebs-Henseleit buffer, pH 7.4, that contained 119 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.5 mM glutamate, and 50 μM carnitine. After this equilibration period, which allowed for balloon insertion into the left-ventricular cavity, the hearts were switched to another buffer reservoir that contained equilibration buffer supplemented with a fatty acid without or with albumin as indicated below. The setup for heart perfusions with albumin-containing buffer and for continuous monitoring of functional parameters using instruments linked to a microcomputer has been described earlier (43). Samples of effluent and influent perfusate, which were collected on ice, were processed immediately for determinations of PO₂, PCO₂, pH, and free Ca²⁺ or stored at –20°C until analysis for citrate and succinate release rates. At the end of the experiments, the hearts were freeze-clamped and stored in liquid nitrogen.

Perfusion Protocols

Hearts were perfused under normoxia or low-flow ischemia (LFI) with nonrecirculating equilibration buffer supplemented with a fatty acid: either 0.2 mM octanoate (a MCFA) or 0.4 mM oleate (a LCFA complexed to 4% albumin). Perfusion experiments were conducted sequentially. First, we tested our ¹³C protocol with a MCFA because this avoids the use of albumin. We then used a LCFA complexed to albumin to assess the physiological significance of our findings with the MCFA.

After an equilibration period of 15–25 min, two groups of hearts were perfused under normoxia for 30 min before freeze-clamping. Four other groups of hearts underwent an additional 90 min of perfusion at 1 ml/min in the absence or presence of 1 μM norepinephrine (LFI/NE). The addition of NE simulates the increase of catecholamines that occur under ischemia and in cardiac patients (21, 37, 38). Unlabeled glutamate was replaced by [U-¹³C₆, ¹⁵N]glutamate (99% for 1) the last 30 min of normoxic perfusion, and 2) 1 min after the beginning of LFI. Note that the concentrations of ionized calcium and endogenous free fatty acids for the 4% albumin-containing buffer were determined to be 1.2 and 0.3 mM, respectively. Thus total free fatty acid concentration for the LCFA group was 0.7 mM.

Analytical Procedures

GC-MS. Citrate and succinate releases and ¹³C MID of tissue CAC intermediates were determined by methods that have been described previously (4, 5, 16, 43). All metabolites were analyzed as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives on a Hewlett-Packard 5890 series II plus GC coupled to a 5972 mass-selective detector equipped with an HP-5 fused silica capillary column (50 m, 0.2-mm inner diameter, 0.33-μm film thickness). Concentrations of CAC intermediates were deter-

mined in tissue samples spiked with [1,5-¹³C₂]citrate, [1,4-¹³C₂]succinate, and [U-¹³C₄]fumarate. Quantification was achieved using standard curves for isocitrate, α-KG, and malate.

Other assays. PO₂, PCO₂, free Ca²⁺, and pH were determined in influent and effluent perfusates collected under normoxia (18 min) or LFI (88 min) using a pH, blood gas, and electrolyte analyzer (ABL 70 series, Radiometer; Copenhagen). For the determination of enzyme activities (citrate synthase, aconitase, and NAD⁺- and NADP⁺-ICDH), frozen powdered tissues were homogenized in solution that contained (in mM) 180 KCl, 5 MOPS, and 2 EDTA, pH 7.4. After sequential centrifugation at 800 and 6,000 *g* for 10 min at 4°C, the final supernatant was collected and stored at –80°C pending the assays. Enzyme activities were assayed by monitoring the kinetics of optical density of NADH or NADPH (340 nm) measured on a Hewlett-Packard 8452A spectrophotometer. Citrate synthase and NAD⁺-ICDH were assayed by standard procedures (22). The procedure of Nulton-Persson and Szveda (25) was slightly modified for aconitase. Heart tissue samples were added to the incubation mixture that contained 5 mM citrate, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM NADP⁺, and 1 U/ml ICDH, pH 7.4 (2 ml total volume at 30°C). NADP⁺-ICDH activity was measured with a commercial kit (Sigma Diagnostics). Protein contents were determined with a Bio-Rad kit, and BSA served as a standard. Enzyme activities are expressed as units per milligram of total protein, where 1 unit of enzyme activity is defined as the amount catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate per minute at 30°C.

Calculations

Myocardial O₂ consumption (M \dot{V} O₂, μmol/min) was calculated from the product of O₂ concentration (mM) differences between influent and effluent perfusates and coronary flow rates (ml/min). A value of 1.06 mM was taken as the concentration of dissolved O₂ at 100% saturation (40). Intracellular pH (pH_i) was estimated using venous CO₂ pressure (PCO₂, mmHg) as described by Bünger et al. (2) as follows: pH_i = 7.524e^(-0.0008786 × PCO₂). The rate pressure product (RPP, mmHg × beats/min) was calculated from the product of left ventricular developed pressure (LVDP, mmHg) and heart rate (HR, beats/min). As an estimate of cardiac efficiency, RPP was divided by M \dot{V} O₂.

Areas under the GC fragmentograms were determined by computer integration and corrected for naturally occurring heavy isotopes (8). GC-MS data are expressed as molar percent enrichment (MPE) as defined previously (5, 16, 43). Briefly, the absolute MPE of individual ¹³C-labeled mass isotopomers (M_i) of a given metabolite was calculated as follows

$$\text{MPE (M}_i\text{)} = \%A_{M_i}/[A_M + \sum A_{M_i}] \quad (1)$$

where A_M and A_{M_i} represent the peak area of GC ion fragmentograms corrected for natural abundance that correspond to the unlabeled (M) and ¹³C-labeled (M_i) where *i* ranges from 1 to *n*, *n* being the number of carbon atoms.

Relative substrate flux through the reversal ICDH and aconitase reactions was calculated from the MPE in M5 of citrate and α-KG as described elsewhere (7)

$$\text{FC}_{\alpha\text{-KG}\rightarrow\text{CIT}} = \text{CIT}_{M5}/\alpha\text{-KG}_{M5} \quad (2)$$

where FC_{α-KG→CIT} is the fractional contribution (FC) of α-KG to citrate via the reversal of NADP⁺-ICDH and aconitase reactions, and α-KG_{M5} and CIT_{M5} are the molar fractions of M5 α-KG and M5 citrate, respectively. The molar fraction is the MPE divided by 100. The term (1 – FC_{α-KG→CIT}) repre-

sents the fraction of citrate molecules coming from the CAC through the citrate synthase reaction.

Statistical Analysis

Individual enrichments are the average of two to five GC-MS injections. Data are expressed as means \pm SE of n heart perfusions. Statistical significance at $P < 0.05$ of differences between mean values was assessed by one-way ANOVA followed by a Bonferroni multiple-comparison post-test as indicated.

RESULTS

As a whole, most parameters (functional, physiological, and metabolic) measured in hearts perfused with nonrecirculating buffer that contained 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μ M carnitine, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.5 mM glutamate, and either 0.2 mM octanoate or 0.4 mM oleate were greatly affected by LFI.

Because the effects of LFI in the absence or presence of NE were similar, we present the results obtained with NE only as it has greater clinical relevance. Although a detailed comparison of the effects of MCFA vs. LCFA was beyond the scope of this paper, the data are presented together, because we observed only small differences between these two groups of heart perfusions.

Functional and Physiological Parameters

Values for the various functional and physiological parameters of hearts perfused under normoxia or LFI/NE with octanoate or oleate are shown in Figs. 2 and 3. All hearts perfused under normoxia beat spontaneously at a rate of 319 ± 6 beats/min ($n = 29$) during the entire protocol with a coronary flow rate of 9.4 ± 0.6 ml/min and systolic and diastolic pressures of 106 ± 1.9 and 6.4 ± 0.6 mmHg, respectively. Upon reduction of coronary flow to 1 ml/min, there was a progressive decrease in HR, LVDP, and dP/dt_{max} , which stabilized after 10 min (Fig. 2). $M\dot{V}O_2$ showed a concomitant decrease (Fig. 3A), and consequently cardiac efficiency was increased (Fig. 3B), although the difference did not reach significance for the LCFA group ($P = 0.07$). Finally, pH_i was lower under LFI/NE (MCFA, 7.210 ± 0.012 ; LCFA, 7.289 ± 0.030) than under normoxia (MCFA, 7.293 ± 0.006 ; LCFA, 7.359 ± 0.008). This difference in pH_i reached significance only for the LCFA group ($P < 0.05$).

Release Rates and Tissue Levels of CAC Intermediates

The release rates of citrate and succinate, which are, respectively, indices of mitochondrial fuel abundance (43) and O_2 deprivation (16), were differentially affected by LFI/NE (Fig. 4). A similar trend was observed for the release rates of hearts perfused with octanoate or oleate. However, as a whole, these rates were greater with octanoate than with oleate under both normoxia and LFI/NE. Citrate release rates were decreased three- to fourfold by LFI. However, when expressed relative to $M\dot{V}O_2$ (Fig. 4B), which reflects CAC

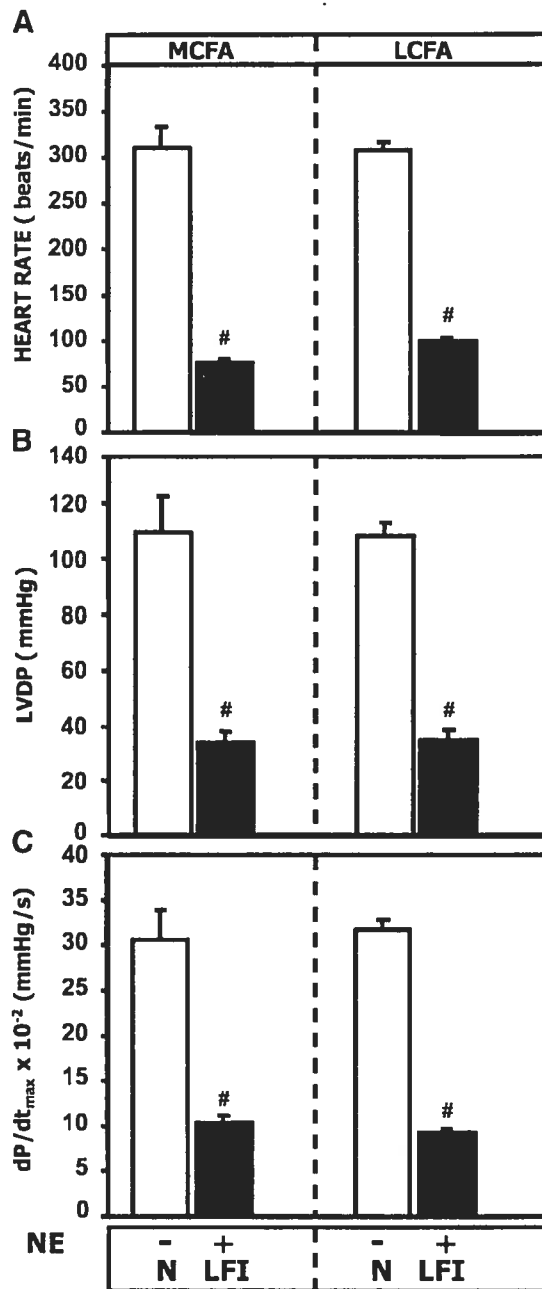


Fig. 2. Cardiac function. Data are means \pm SE for 3–5 experiments. Hearts were perfused with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μ M carnitine, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.5 mM [U-¹³C₆]glutamate, and 0.2 mM octanoate (for MCFA) or 0.4 mM oleate (for LCFA) for 30 min under normoxia (N, open bars) or for 90 min under low-flow ischemia (LFI, 1 ml/min) in the presence of 1 μ M norepinephrine (NE, solid bars). Values for heart rate (A), left ventricular developed pressure (LVDP, B), and dP/dt_{max} (C) were averaged for 30 min during normoxia and for 30–90 min during LFI. LVDP was calculated from the difference in systolic and diastolic pressures. # $P < 0.001$, LFI vs. normoxia.

activity, the rates were increased two- to threefold to reach 1–2.5% of $M\dot{V}O_2$ values. The succinate release rates under normoxia were three- to fivefold lower than those of citrate. They were increased two- to fivefold by

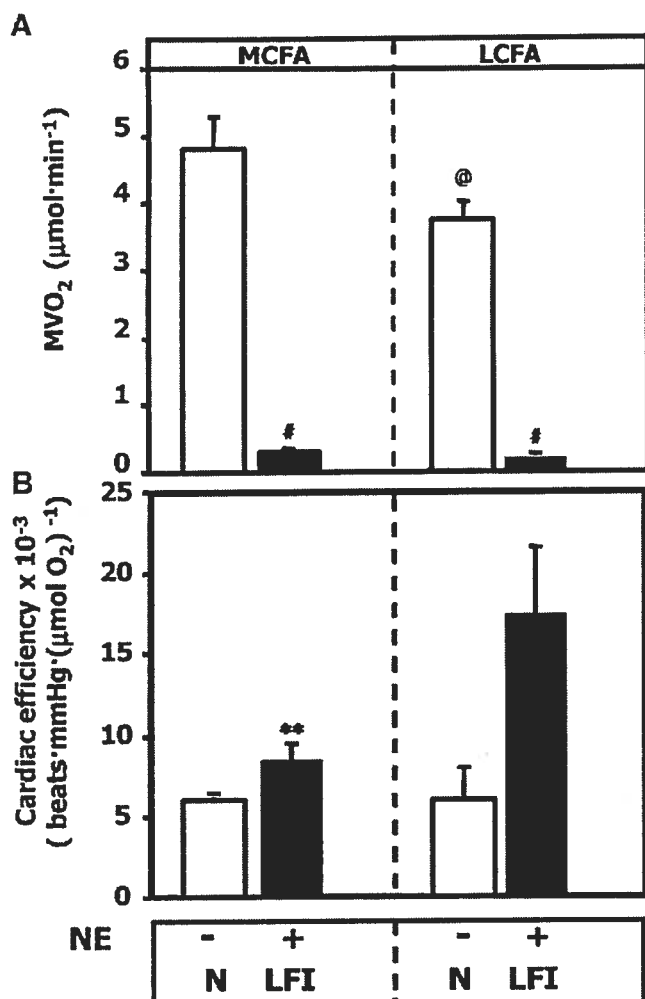


Fig. 3. Myocardial O₂ consumption (MVO₂, A) and cardiac efficiency (B). Data are means ± SE for 3–5 experiments. Hearts were perfused as for Fig. 2. MVO₂ was calculated from differences in PO₂ assessed in samples of influent and effluent perfusates collected at 18 min under normoxia and at 88 min under LFI. #P < 0.001, **P < 0.01, LFI vs. normoxia; @P < 0.05, LCFA vs. MCFA.

LFI/NE (Fig. 4C) and reached values similar to those observed for citrate under normoxia. This effect of LFI/NE was amplified by the expression of succinate release rates relative to MVO₂ (Fig. 4D).

Tissue levels of the various CAC intermediates were differentially affected by LFI/NE (Fig. 5). Compared with normoxia, the tissue levels of citrate were decreased (two- to threefold), whereas those of succinate were increased (six- to ninefold) under LFI/NE. The total pool size of CAC intermediates was similar or greater under LFI/NE than under normoxia, which is in agreement with the data of other researchers (28, 30). Note that under all conditions, tissue citrate levels remained severalfold (24–90) higher than those of isocitrate and α-KG. A similar trend was observed for hearts perfused with octanoate or oleate. However, under both normoxia and LFI/NE, hearts perfused with octanoate showed higher tissue levels for some

CAC intermediates (citrate, isocitrate, succinate, and fumarate).

¹³C Enrichment and Flux Data

Table 1 presents the M4 and M5 isotopomers of citrate, α-KG, succinate, fumarate, and malate isolated from homogenates of hearts perfused with [U-¹³C₅]-glutamate under the different conditions. Influent [U-¹³C₅]-glutamate was enriched at 99% in M5 isotopomers. [U-¹³C₅]-glutamate enters the CAC as M5 isotopomers of α-KG. M5 α-KG is carboxylated to M5 citrate through the reversal of NADP⁺-ICDH and aconitase reactions and is decarboxylated to M4 succinate through normal operation of the CAC. Under all conditions tested, tissue α-KG and citrate were enriched in M5 isotopomers, whereas tissue succinate was enriched in M4 isotopomers. The lower MPE M4 of succinate compared with that of M5 α-KG probably reflects the entry of unlabeled carbons through anaplerosis. Such a dilution at the level of succinate is in agreement with our previous data (5, 16). Similarly, the lower value of MPE M4 for malate and fumarate than for succinate reflects the entrance of unlabeled oxaloacetate coming from pyruvate carboxylation. As a whole, LFI hearts showed higher MPE values for most CAC intermediates. A similar trend was observed under LFI/NE for the MCFA and LCFA groups. Note that the higher value of MPE M5 in tissue α-KG is consistent with the reported increase in glutamate uptake by the O₂-deprived heart (42) and hence probably reflects increased anaplerosis rather than simple exchange.

We calculated the contribution of α-KG to citrate formation from the ratio in M5 enrichment between tissue citrate and α-KG (Eq. 2). Under our perfusion conditions, M5 citrate can only be formed through the reversal of NADP⁺-ICDH and aconitase reactions. The formation of M5 citrate through other pathways involves the following sequence of reactions: M4 malate → M3 pyruvate → M2 acetyl-CoA, or M4 malate → M3 pyruvate → M3 oxaloacetate followed by recombination of M3 oxaloacetate with M2 acetyl-CoA. The contribution of these pathways was considered negligible because of the low values of MPE M4 for tissue malate (Table 1) and MPE M3 for tissue pyruvate (<0.2%, data not shown).

Under normoxia, 3–7% of citrate molecules were formed through the reversal of NADP⁺-ICDH (Fig. 6). The remaining (1 - FC_{α-KG→CIT}) 93–97% of citrate arose from citrate synthase. Fatty acids differently modulated the effects of LFI on the proportion of citrate formed through the reversal of NADP⁺-ICDH: LFI increased this proportion by 40% in the presence of MCFA, whereas it had no effect in the presence of LCFA.

Enzyme Activities

Figure 7 shows the activities of aconitase, NAD⁺-ICDH, and NADP⁺-ICDH expressed as a percentage of citrate synthase as measured in extracts of hearts perfused with MCFA or LCFA (2.10 ± 0.12 and 1.53 ±

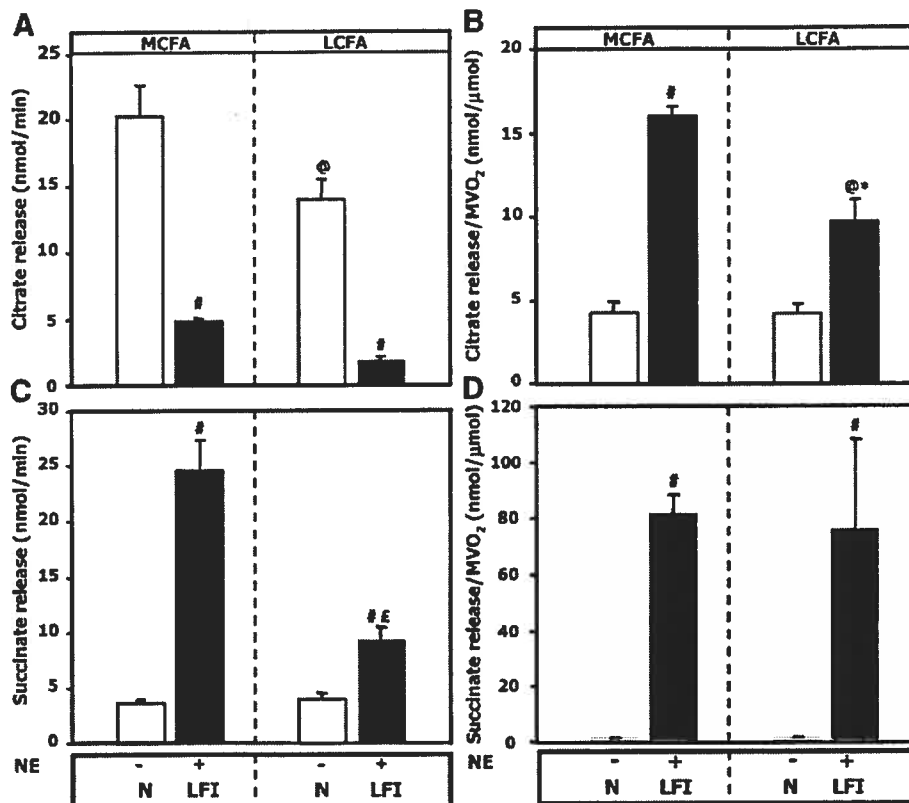


Fig. 4. Release rates of citrate (A and B) and succinate (C and D). Data are means \pm SE for 3–5 experiments. Hearts were perfused as for Fig. 2. Release rates were determined from samples of effluent perfusates collected between 10 and 15 min under normoxia and between 80 and 90 min under LFI. Release rates are expressed in nanomoles per minute (A and C) relative to $M\dot{V}O_2$ (nmol/ μ mol O_2 consumed; B and D). # $P < 0.001$, LFI vs. normoxia; * $P < 0.001$, @ $P < 0.05$, LCFA vs. MCFA.

0.19 U/mg protein, respectively, under all conditions; $P < 0.05$). Note the 100-fold difference in the y-axis scale for the three sets of graphs. Tissue aconitase activity (Fig. 7A) was >10-fold lower than that of citrate synthase and was decreased by LFI/NE. As a whole, aconitase activity was lower for the LCFA group than the MCFA group. NAD⁺- and NADP⁺-ICDH activities (Fig. 7, B and C) were not significantly modified by LFI/NE or the nature of the fatty acid. However, there was more than a 100-fold difference in activities between NAD⁺-ICDH and NADP⁺-ICDH, which represents 1.2–2% and 200–300% of citrate synthase activity, respectively.

DISCUSSION

This study was undertaken to shed some light on the role of mitochondrial NADP⁺-ICDH in the heart. We expanded on a previous investigation, which provided evidence for the reversal of NADP⁺-ICDH in normoxic rat hearts perfused with glucose, lactate, pyruvate, octanoate, and [U-¹³C₅]glutamate (4). In the current study, we assessed the physiological significance of our previous finding by documenting the reversal of NADP⁺-ICDH in hearts perfused with the LCFA oleate. In addition, we tested in part the hypothesis of Sazanov and Jackson (35) on the role of NADP⁺-ICDH. In brief, this hypothesis proposes that in mitochondria, a substrate cycle operates between isocitrate and α -KG where NAD⁺-ICDH generates α -KG and NADP⁺-ICDH generates isocitrate. The NADPH used in the

reverse reaction of NADP⁺-ICDH is supplied by the H⁺-transhydrogenases driven by the proton electrochemical gradient (see Fig. 1). The isocitrate \leftrightarrow α -KG cycle provides a mechanism by which CAC activity could be tightly controlled by modifiers of NAD⁺-ICDH and the energy state of the inner mitochondrial membrane. This hypothesis was formulated on the basis of the known properties of the isolated enzymes and the available information on substrate concentrations in the matrix of isolated mitochondria as well as thermodynamic parameters. One prediction of this hypothesis is that compared with the CAC, flux through the reversal of NADP⁺-ICDH should increase under conditions of O_2 deprivation.

As a model of O_2 deprivation, we chose LFI that was achieved by reduction of flow to 1 ml/min in the absence or presence of NE. As a whole, measured changes in the various indices reflecting the functional, physiological, and metabolic status of perfused hearts after reduction of flow were independent of NE and indicated the heart's adaptation to this state of O_2 deprivation. First, in LFI hearts, the indices of contractile function and $M\dot{V}O_2$ were decreased, whereas cardiac efficiency was unchanged or increased (see Figs. 2 and 3). This probably results from a switch from fatty acid to carbohydrate utilization (23, 27, 32). Second, LFI hearts perfused with MCFA or LCFA maintained values similar to normoxic hearts for the total pool size of CAC intermediates and the tissue citrate-to-isocitrate concentration ratios (30–33 with MCFA and 70–90

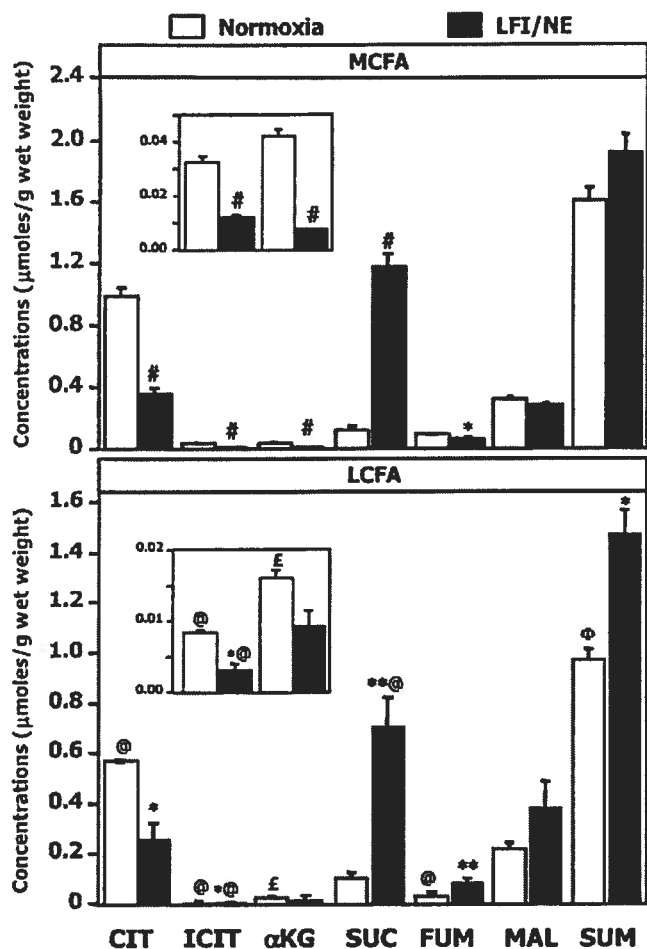


Fig. 5. Tissue levels of citric acid cycle (CAC) intermediates. Data are means \pm SE for 3–5 experiments. Hearts were perfused as for Fig. 2. Magnifications of the scale (insets) present the concentrations of isocitrate and α -KG. # $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, LFI vs. normoxia; ‡ $P < 0.001$, ⊕ $P < 0.01$, ⊕ $P < 0.05$, LCFA vs. MCFA. CIT, citrate; ICIT, isocitrate; SUC, succinate; FUM, fumarate; MAL, malate.

with LCFA). This indicates tight regulation of CAC enzymes under both normoxia and LFI. The site of this regulation differed between normoxia and LFI as indicated by substantial differences in the release and

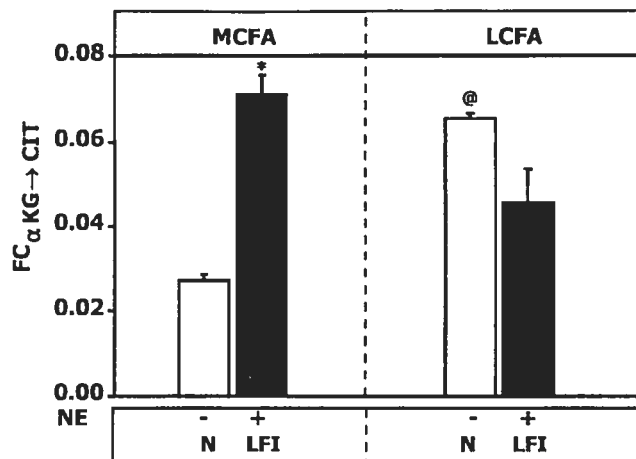


Fig. 6. Fractional contribution (FC) of α -KG to citrate formation through the reversal of NADP⁺-ICDH. Data are means \pm SE for 3–5 experiments. Hearts were perfused as for Fig. 2. Mass isotopomer distributions of α -KG and citrate (see Table 1) were introduced into Eq. 2. * $P < 0.05$, LFI vs. normoxia; ⊕ $P < 0.05$, LCFA vs. MCFA.

tissue levels of citrate and succinate (see Figs. 4 and 5). Expressed relative to $\dot{M}\dot{V}O_2$, the combined release of citrate and succinate was raised from 0.5% under normoxia to 10% under LFI (see Fig. 4). Because CAC pool size is unchanged or increased under LFI, CAC efflux must have been compensated by the entry of anaplerotic carbons at the level of pyruvate (5, 28, 29, 43) and/or α -KG (42). Observed differences in tissue levels of citrate and succinate under normoxia and LFI, which are in agreement with other studies (28–30), are consistent with the CAC operating in two spans: one from acetyl-CoA to α -KG, and the other from α -KG to oxaloacetate (31).

We observed a similar trend for the effects of LFI on the release and tissue levels of CAC intermediates for hearts perfused with octanoate and oleate (see Figs. 4 and 5). However, the magnitude of changes observed under both normoxia and LFI was greater for the MCFA group. These results are consistent with the fact that in contrast to LCFA, MCFA β -oxidation is not regulated at the level of carnitine palmitoyl transferase 1 (39). The addition of NE under LFI only marginally affected most contractile, physiological,

Table 1. Molar percent enrichment in M4 and M5 isotopomers of tissue CAC intermediates

| | Citrate | | α -KG | | Succinate | Fumarate | Malate |
|----------|-------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| | M4 | M5 | M4 | M5 | M4 | M4 | M4 |
| MCFA | | | | | | | |
| Normoxia | 0.20 \pm 0.01 | 0.11 \pm 0.01 | 0.31 \pm 0.04 | 4.26 \pm 0.41 | 1.54 \pm 0.08 | 0.46 \pm 0.07 | 0.30 \pm 0.03 |
| LFI/NE | 0.63 \pm 0.03* | 0.50 \pm 0.03* | 0.66 \pm 0.03 | 7.08 \pm 0.18 | 1.46 \pm 0.04 | 1.10 \pm 0.06† | 0.95 \pm 0.05* |
| LCFA | | | | | | | |
| Normoxia | 0.24 \pm 0.01 | 0.21 \pm 0.01 | 0.30 \pm 0.07 | 3.21 \pm 0.18 | 2.04 \pm 0.31 | 0.63 \pm 0.03 | 0.62 \pm 0.08 |
| LFI/NE | 0.96 \pm 0.12*§ | 0.41 \pm 0.06 | 0.76 \pm 0.12‡ | 9.59 \pm 1.48* | 1.69 \pm 0.28 | 1.88 \pm 0.22*§ | 1.57 \pm 0.18*§ |

Values are means \pm SE for 3 or 4 experiments. Hearts were perfused with 5.5 mM glucose, 8 nM insulin, 50 μ M carnitine, 1 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.5 mM [U-¹³C₆]glutamate, and 0.2 mM octanoate (medium-chain fatty acids, MCFA) or 0.4 mM oleate (long-chain fatty acids, LCFA) for 30 min under normoxia or for 90 min under low-flow ischemia (LFI, 1 ml/min) in the presence of 1 μ M norepinephrine (NE). Note that under all conditions tested, molar percent enrichment (MPE), values for M1–M3 for all citric acid cycle CAC intermediates were between 0.06 and 0.50%, and MPE values for M6 for citrate were negligible. * $P < 0.001$, † $P < 0.01$, ‡ $P < 0.05$, LFI vs. normoxia; § $P < 0.01$, LCFA vs. MCFA.

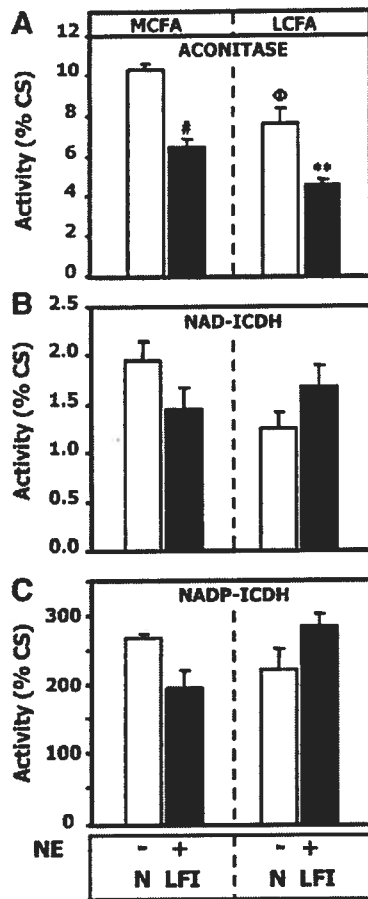


Fig. 7. Enzyme activities. Data are means \pm SE for 3–5 experiments. Hearts were perfused as for Fig. 2. Enzyme activities were assessed in homogenates of powdered, freeze-clamped hearts. Activities of aconitase (A), NAD⁺-ICDH (B), and NADP⁺-ICDH (C) are expressed relative to that of citrate synthase (CS). Note the 100-fold difference in the y-scale of the three sets of graphs. [#] $P < 0.001$, ^{**} $P < 0.01$, LFI vs. normoxia; ^{*} $P < 0.01$, LCFA vs. MCFA.

and metabolic parameters. Possibly, under this specific condition, the increase in calcium levels resulting from NE addition is counteracted by adaptive mechanisms such as the opening of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, which decreases intracellular calcium levels and hence downregulates contractile activity (9). Thus based on the aforementioned results, we conclude that similar to the pig heart perfused *in vivo* (28), LFI in the rat heart perfused *ex vivo* mimics to some extent a state of hibernation (34), which is independent of the nature of the fatty acid added.

The results of this study demonstrate a small flux through the reversal of NADP⁺-ICDH in both normoxic and LFI rat hearts perfused in the presence of MCFA or LCFA, representing 3–7% of flux through citrate synthase (see Fig. 6). This small reverse flux in perfused rat hearts contrasts with that measured in perfused rat livers (~45%; see Ref. 7). This may be explained by the fact that in the heart, NADP⁺-ICDH is almost exclusively located in mitochondria, whereas

in the liver, the cytosolic isoform represents 85% of total NADP⁺-ICDH activity (19) and participates in fatty acid synthesis from glutamate (13). Nevertheless, based on the following reasoning, we concluded low reverse-flux values measured in perfused hearts reflected net flux through reversal of NADP⁺-ICDH rather than simple isotopic equilibration. The values of MPE M5 for tissue α -KG were more than 10-fold greater than those of citrate (Table 1). Rapid isotopic equilibration between these two metabolites would result in similar MPE values. Such a situation is observed for malate and fumarate where rapid interconversion is catalyzed by fumarase (Table 1). Unfortunately, we were unable to determine with precision the MPE M5 value of tissue isocitrate in all tissue samples because of its low concentration. Furthermore, the small peak of isocitrate elutes from the GC column very shortly after the much larger peak of citrate. However, the analysis of some tissue samples revealed that the MPE of citrate reflected that of isocitrate (data not shown), which supports a reversible interconversion by aconitase.

In hearts perfused in the presence of octanoate with physiological concentrations of glucose, insulin, lactate, pyruvate, and glutamate, the magnitude of the reverse NADP⁺-ICDH flux, expressed relative to the flux through citrate synthase, was increased by LFI as predicted by Sazanov and Jackson (35) (see Fig. 6, left). The reverse NADP⁺-ICDH flux was, however, not affected by LFI when octanoate was replaced with the physiological LCFA oleate complexed to fatty acid-poor albumin (see Fig. 6, right). One possible explanation for the differential effects of MCFA and LCFA on the reverse NADP⁺-ICDH flux could be the inhibition of H⁺-transhydrogenases by palmitoyl-CoA (12). In the proposed regulatory substrate cycle between isocitrate and α -KG, H⁺-transhydrogenases, whose activity occurs in the heart (36), generates NADPH for NADP⁺-ICDH (see Fig. 1). Although palmitate was not supplied exogenously to the heart, it could be present as endogenous free fatty acids in our albumin preparation. Another possible explanation is that the metabolism of MCFA and LCFA differently affects the concentrations of effectors of enzymes involved in the metabolism of citrate, isocitrate, and α -KG (18). In rat hearts perfused under normoxia, state 4 respiration (high NADH/NAD⁺ and ATP/P_i limited) prevails with octanoate, whereas state 3 respiration (NADH limited) prevails with the LCFA palmitate (17). A high rate of NADH production (especially under conditions of limited O₂ supply) could shift the redox state of the NADP⁺ pool via H⁺-transhydrogenases, and this in turn would lead to a change in flux through the reversal of NADP⁺-ICDH. Additional investigations are, however, needed to verify and substantiate these explanations. The effects of MCFA could be of clinical relevance because substitution of LCFA with MCFA in the diet prevents the development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (11).

Our enzyme-activity data substantiate the notion of high NADP⁺-ICDH activity in the heart (Fig. 7). The

measured activities varied in the following order: NADP⁺-ICDH > citrate synthase > aconitase > NAD⁺-ICDH. The decreased activity of tissue aconitase by LFI (Fig. 7) is consistent with inactivation of this enzyme by free radicals (25) whose production is increased in LFI hearts (1). Because of the low activity of tissue NAD⁺-ICDH compared to that of other enzymes, one may conclude that oxidation of isocitrate by NADP⁺-ICDH would be needed to maintain normal CAC flux. However, assuming that 1 g wet weight contains 0.2 g of protein, maximal NAD⁺-ICDH activity is estimated to be 4 μmol/min × g wet weight. This activity is threefold greater than CAC flux values, which are estimated [using the MVO₂ value (29)], to be ~1.5 and 0.1 μmol/min × g wet weight under normoxia and LFI/NE, respectively.

The participation of NADP⁺-ICDH in mitochondrial isocitrate oxidation in the heart is a controversial subject (6, 12, 33). Taken together, our ¹³C data demonstrate a net substrate flux from α-KG to isocitrate through the reversal of NADP⁺-ICDH as proposed by Sazanov and Jackson's hypothesis (35). However, our data do not provide evidence for net substrate flux through the following reactions: glutamate → α-KG → isocitrate → citrate → mitochondrial citrate efflux, as proposed by Thomassen et al. (42). Note that mitochondrial citrate efflux occurs with a proton in exchange for malate and hence would affect the electrochemical gradient. The presence of M5 isotopomers of citrate in heart tissue as well as in the effluent (not shown) is more likely to be explained by isotopic equilibration between citrate and isocitrate catalyzed by aconitase. The concentration ratio of citrate to isocitrate measured in normoxic and LFI hearts perfused with LCFA (70–90) or MCFA (30–33) is greater than that found at equilibrium for the aconitase reaction in vitro (15–20; see Ref. 19). This would be consistent with isocitrate being pulled through the NAD⁺-ICDH reaction. Using modeling data on [¹⁴C]bicarbonate incorporation into citrate in perfused rat hearts, Nuutinen et al. (26) concluded that citrate was being labeled through the reversal of NADP⁺-ICDH, but the resulting net substrate flux was in the forward reaction. The ¹³C protocol that will quantitate the partitioning of isocitrate formed by the reversal of NADP⁺-ICDH between oxidation by NAD⁺-ICDH and citrate synthesis/efflux remains to be identified.

A reverse flux through NADP⁺-ICDH is inconsistent with an antioxidant role, where the enzyme would supply NADPH for regeneration of reduced glutathione by glutathione reductase. Such a role was proposed by Jo et al. (14) based on evidence obtained from NIH3T3 cells. However, the situation differs in the heart, where the mitochondrial NADPH/NADP⁺ ratio is high (>50; Refs. 19, 41) compared with <1 in NIH3T3 cells. Because NADPH potentiates the inhibition of NAD⁺-ICDH by NADH, reverse NADP⁺-ICDH activity could be crucial to prevent a rise in the NADPH/NADP⁺ ratio, especially under conditions where NADH accumulates (for example, under state 4 respiration). It remains to be clarified as to whether

cardiac mitochondrial NADP⁺-ICDH could be forced to participate in NADPH generation at least under some conditions. For example, it could occur when the supply of NADH limits the activity of H⁺-transhydrogenases and hence NADPH generation (15). Such a situation may prevail if oxidative stress is increased in normoxic hearts, especially under state 3 respiration when NADH supply also limits the mitochondrial respiratory chain. However, future studies should investigate the possibility of a modulation of the NADP⁺-ICDH by oxidative stress.

In summary, this study shows that ¹³C substrates and mass isotopomer analysis provide a dynamic picture of substrate fluxes through NADP⁺-ICDH in the rat heart perfused under normoxia or LFI. Our ¹³C data show that this reaction operates in the reverse direction of the CAC. A reverse NADP⁺-ICDH flux coupled with the H⁺-transhydrogenase activities may be crucial to the fine regulation of CAC activity and hence of energy production for contraction of the normoxic and O₂-deprived heart.

The authors thank Dr. John Chatham for helpful comments. Thanks are also due to Ovid Da Silva of the Research Support Office, Centre Hospitalier Universitaire de l'Université de Montréal, for editing this text.

Part of this work was presented at the following meetings: Experimental Biology (1997), Biomedical Engineering Society (1998), International Congress on Pathophysiology (1998), and World Congress of the International Society for Heart Research (2001).

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research Grant 10816 (to C. Des Rosiers).

Present address of B. Comte: Chaire de Pharmacie, local 1727, Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, QC, Canada, H3T 1C5.

REFERENCES

1. Brunet J, Boily MJ, Cordeau S, and Des Rosiers C. Effects of *N*-acetylcysteine in the rat heart reperfused after low-flow ischemia: evidence for a direct scavenging of hydroxyl radicals and a nitric oxide-dependent increase in coronary flow. *Free Radic Biol Med* 19: 627–638, 1995.
2. Bünger R, Mallet RT, and Hartman DA. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem* 180: 221–233, 1989.
3. Cheung PY, Danial H, Jong J, and Schulz R. Thiols protect the inhibition of myocardial aconitase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 350: 104–108, 1998.
4. Comte B, Vincent G, Bouchard B, and Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ¹³C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117–26124, 1997.
5. Comte B, Vincent G, Bouchard B, Jette M, Cordeau S, and Des Rosiers C. A ¹³C mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125–26131, 1997.
6. Dalziel K and Londesborough JC. The mechanisms of reductive carboxylation reactions. Carbon dioxide or bicarbonate as substrate of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-linked isocitrate dehydrogenase and malic enzyme. *Biochem J* 110: 223–230, 1968.
7. Des Rosiers C, Fernandez CA, David F, and Brunengraber H. Reversibility of the mitochondrial isocitrate dehydrogenase reaction in the perfused rat liver. Evidence from isotopomer analysis of citric acid cycle intermediates. *J Biol Chem* 269: 27179–27182, 1994.

8. Des Rosiers C, Montgomery JA, Desrochers S, Garneau M, David F, Mamer OA, and Brunengraber H. Interference of 3-hydroxyisobutyrate with measurements of ketone body concentration and isotopic enrichment by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 173: 96–105, 1988.
9. Flagg TP and Nichols CG. Sarcolemmal K_{ATP} channels in the dark: molecular mechanisms brought to light, but physiologic consequences still in the dark. *J Cardiovasc Electrophysiol* 12: 1195–1198, 2001.
10. Gabriel JL, Zervos PR, and Plaut GW. Activity of purified NAD-specific isocitrate dehydrogenase at modulator and substrate concentrations approximating conditions in mitochondria. *Metabolism* 35: 661–667, 1986.
11. Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp FF Jr, Kurtz T, Pravenec M, and Abumrad NA. Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem* 276: 23661–23666, 2001.
12. Hansford RG and Johnson RN. The steady state concentrations of coenzyme A-SH and coenzyme A thioester, citrate, and isocitrate during tricarboxylate cycle oxidations in rabbit heart mitochondria. *J Biol Chem* 250: 8361–8375, 1975.
13. Holleran AL, Briscoe DA, Fiskum G, and Kelleher JK. Glutamine metabolism in AS-30D hepatoma cells. Evidence for its conversion into lipids via reductive carboxylation. *Mol Cell Biochem* 152: 95–101, 1995.
14. Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW, Song BJ, and Huh TL. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 276: 16168–16176, 2001.
15. Kehrer JP and Lund LG. Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17: 65–75, 1994.
16. Laplante A, Vincent G, Poirier M, and Des Rosiers C. Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart: a ¹³C mass isotopomer study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 272: E74–E82, 1997.
17. Lerch R. Oxidative substrate metabolism during postischemic reperfusion. *Basic Res Cardiol* 88: 525–544, 1993.
18. Liu YQ, Tornheim K, and Leahy JL. Shared biochemical properties of glucotoxicity and lipotoxicity in islets decrease citrate synthase activity and increase phosphofructokinase activity. *Diabetes* 47: 1889–1893, 1998.
19. Lowenstein JM. The tricarboxylic acid cycle. In: *Metabolic Pathways*, edited by Greenberg DM. New York: Academic, 1967, p. 147–267.
20. Luo H, Shan X, and Wu J. Expression of human mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase during lymphocyte activation. *J Cell Biochem* 60: 495–507, 1996.
21. Mann DL. Basic mechanisms of disease progression in the failing heart: the role of excessive adrenergic drive. *Prog Cardiovasc Dis* 41: 1–8, 1998.
22. Morgunov I and Srere PA. Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate. *J Biol Chem* 273: 29540–29544, 1998.
23. Neely JR and Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of the heart muscle. *Annu Rev Physiol* 36: 413–459, 1974.
24. Nielsen TT, Henningsen P, Bagger JP, Thomsen PE, and Ejjolfsson K. Myocardial citrate metabolism in control subjects and patients with coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 40: 575–580, 1980.
25. Nulton-Persson AC and Szweda LI. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276: 23357–23361, 2001.
26. Nuutinen EM, Peuhkurinen KJ, Pietilainen EP, Hiltunen JK, and Hassinen IE. Elimination and replenishment of tri-carboxylic acid-cycle intermediates in myocardium. *Biochem J* 194: 867–875, 1981.
27. Opie LH. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia. *Circ Res* 38: I52–I74, 1976.
28. Panchal AR, Comte B, Huang H, Dudar B, Roth B, Chandler M, Des Rosiers C, Brunengraber H, and Stanley WC. Acute hibernation decreases myocardial pyruvate carboxylation and citrate release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1613–H1620, 2001.
29. Panchal AR, Comte B, Huang H, Kerwin T, Darvish A, Des Rosiers C, Brunengraber H, and Stanley WC. Partitioning of pyruvate between oxidation and anaplerosis in swine hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2390–H2398, 2000.
30. Peuhkurinen KJ, Takala TE, Nuutinen EM, and Hassinen IE. Tricarboxylic acid cycle metabolites during ischemia in isolated perfused rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 244: H281–H288, 1983.
31. Randle PJ, England PJ, and Denton RM. Control of the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis during acetate utilization in rat heart. *Biochem J* 117: 677–695, 1970.
32. Randle PJ and Tubbs PK. Carbohydrate and fatty acid metabolism. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. The Heart*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1979, sect. 2, vol. I, chapt. 23, p. 805–844.
33. Reynolds CH, Kuchel PW, and Dalziel K. Equilibrium binding of coenzymes and substrates to nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart mitochondria. *Biochem J* 171: 733–742, 1978.
34. Rinaldi CA and Hall RJ. Myocardial stunning and hibernation in clinical practice. *Int J Clin Pract* 54: 659–664, 2000.
35. Sazanov LA and Jackson JB. Proton-translocating transhydrogenase and NAD- and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria. *FEBS Lett* 344: 109–116, 1994.
36. Sazanov LA and Jackson JB. Cyclic reactions catalysed by detergent-dispersed and reconstituted transhydrogenase from beef-heart mitochondria; implications for the mechanism of proton translocation. *Biochim Biophys Acta* 1231: 304–312, 1995.
37. Schömig A and Richardt G. The role of catecholamines in ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 16, Suppl 5: S105–S112, 1990.
38. Schömig A and Richardt G. Cardiac sympathetic activity in myocardial ischemia: release and effects of noradrenaline. *Basic Res Cardiol* 85, Suppl 1: 9–30, 1990.
39. Schulz H. Regulation of fatty acid oxidation in heart. *J Nutr* 124: 165–171, 1994.
40. Starnes JW, Wilson DF, and Erecinska M. Substrate dependence of metabolic state and coronary flow in perfused rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 249: H799–H806, 1985.
41. Sundqvist KE, Heikkilä J, Hassinen IE, and Hiltunen JK. Role of NADP⁺ (corrected)-linked malic enzymes as regulators of the pool size of tricarboxylic acid-cycle intermediates in the perfused rat heart. *Biochem J* 243: 853–857, 1987.
42. Thomassen AR, Nielsen TT, Bagger JP, and Henningsen P. Myocardial exchanges of glutamate, alanine and citrate in controls and patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)* 64: 33–40, 1983.
43. Vincent G, Comte B, Poirier M, and Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: a window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E846–E856, 2000.
44. Wanders RJ, van Doorn HE, and Tager JM. The energy-linked transhydrogenase in rat liver in relation to the reductive carboxylation of 2-oxoglutarate. *Eur J Biochem* 116: 609–614, 1981.

ANNEXE 2

CURRICULUM VITAE ACADÉMIQUE

CURRICULUM VITAE

Geneviève Vincent
Laboratoire du métabolisme intermédiaire (Y-3616)
CHUM, Hôpital Notre-Dame
1560 rue Sherbrooke Est
Montréal, Québec
H2L 4M1

FORMATION ACADÉMIQUE

- 1993-1996 Baccalauréat en biochimie, Université de Montréal
- 1996- Maîtrise en Biochimie, Université de Montréal
Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame
Laboratoire du métabolisme intermédiaire
Directeur de recherche: Dr Christine Des Rosiers
- 1998 Passage direct maîtrise-doctorat
- 1998- Doctorat en biochimie, Université de Montréal
Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame
Laboratoire du métabolisme intermédiaire
Directeur de recherche: Dr Christine Des Rosiers

BOURSE ET PRIX D'EXCELLENCE

- 1997-2002 Bourse de stagiaire de recherche
Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC)
- 2001 Prix d'excellence - Présentation par affiches
*XVII World Congress of the International Society for Heart
Research*. Winnipeg, Manitoba, Canada, 6-11 juillet 2001
- 2002 Bourse d'excellence du CHUM

CONNAISSANCES ACQUISES AUX ÉTUDES GRADUÉES

- Microchirurgies animales
- Perfusions *ex vivo* de cœur de rat : système *Langendorff* et du cœur au travail
- Utilisation d'isotopes stables dans des études métaboliques
- Analyse d'isotopomères par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)
- Cinétiques enzymatiques
- Rédaction de manuscrits
- Présentations orales et par affiches à divers congrès internationaux

SUPERVISION D'ÉTUDIANT(E)S

- 1999 Supervision de stagiaire de recherche
Julie Miron, 1^{er} cycle, biochimie, Université de Montréal
- 2000 Supervision de stagiaire de recherche
Maya Khairallah, 1^{er} cycle, biochimie, Université de Montréal
- 1999-2001 Visites explicatives du laboratoire de recherche aux
étudiant(e)s de 1^{er} cycle, nutrition, Université de Montréal
Cours d'initiation à la recherche - NUT 3033

EXPÉRIENCES DE TRAVAIL

- 2003 Auxiliaire d'enseignement au département de biochimie.
Université de Montréal
Transformation et analyse d'un plasmide recombinant - BCM 2958
- 2002 Auxiliaire d'enseignement au département de biochimie.
Université de Montréal.
Analyse d'un plasmide recombinant - MMD 1024
- 2002 Auxiliaire d'enseignement au département de biochimie.
Université de Montréal
Transformation et analyse d'un plasmide recombinant - BCM 2958
- 2001 Auxiliaire d'enseignement au département de biochimie.
Université de Montréal
Cinétique enzymatique de la phosphatase alcaline - MMD 1024
- 1997-2000 Auxiliaire d'enseignement au département de biochimie.
Université de Montréal
Transformation et analyse d'un plasmide recombinant - BCM 2958
- 1997-1998 Assistante de recherche
Projet canadien de cristallisation de protéines en microgravité
sur la station orbitale MIR (projet CAPE).
Projet conjoint entre l'Agence Spatiale Canadienne et
l'Université de Montréal
Agence Spatiale Canadienne, St-Hubert

PUBLICATIONS

Manuscripts publiés :

1. **Vincent G**, Khairallah M, Bouchard B & Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased rat heart using ^{13}C -substrates and ex vivo perfusion in the working mode. *Mol Cell Biochem* 242 : 89-99, 2003.
2. Poirier M, **Vincent G**, Reszko AE, Bouchard B, Kelleher JK, Brunengraber H & Des Rosiers C. Probing the link between citrate and malonyl-CoA in perfused rat hearts. *Am J Physiol* 283: H1379-1386, 2002.
3. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B, Khairallah M & Des Rosiers C. Modulation of substrate flux through the reversal of the isocitrate dehydrogenase reaction by fatty acids. *Am J Physiol* 283: H1505-H1514, 2002.
4. Danialou G, Comtois AS, Dudley R, Karparti G, **Vincent G**, Des Rosiers C & Petrof BJ. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure an injury. *FASEB J* 15: 1655-1667, 2001.
5. **Vincent G**, Comte B, Poirier M & Des Rosiers C. Citrate release by perfused rat hearts: A window on mitochondrial cataplerosis. *Am J Physiol* 278: E846-E856, 2000.
6. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B & Des Rosiers C. Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C -labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26117-26124, 1997.
7. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B & Des Rosiers C. A ^{13}C -mass isotopomer study of anaplerotic pyruvate carboxylation in perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272: 26125-26131, 1997.
8. Laplante A, **Vincent G**, Poirier M & Des Rosiers C. Effects and metabolism of fumarate in the perfused rat heart. A ^{13}C mass isotopomer study. *Am J Physiol* 35: E74-E82, 1997.

Manuscripts en rédaction :

9. **Vincent G**, Bouchard B, Khairallah M & Des Rosiers C. Citrate synthesis and release by perfused working rat hearts and their modulation by fatty acids. *Am J Physiol*.
10. Brunet J, Laplante A, Bouchard B, **Vincent G** & Des Rosiers C. Metabolic substrates and glybenclamide modulate the flow response of rat hearts reperfused with N-acetylcysteine. *Am J Physiol*.

COMMUNICATIONS

1. **Vincent G**, Khairallah M, Bouchard B, Kelleher JK & Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased heart using ^{13}C -substrates and *ex vivo* perfusion in the working mode. 4^e Journée Scientifique des Étudiants du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal, le 18 décembre 2001.
2. **Vincent G**, Khairallah M, Bouchard B, Kelleher JK & Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased heart using ^{13}C -substrates and *ex vivo* perfusion in the working mode. XVII World Congress of the International Society for Heart Research, Satellite meeting in Banff, Alberta, Canada, July 2-5, 2001. (Présentation orale) *J Mol Cell Cardiol*. Volume 33, Number 6, p. A180.
3. Comte B, **Vincent G**, Bouchard B & Des Rosiers C. Fatty acids modulate flux through the reversal of the isocitrate dehydrogenase (ICDH) reaction in the ischemic rat heart. XVII World Congress of the International Society for Heart Research, Satellite meeting in Banff, Alberta, Canada, July 2-5, 2001. *J Mol Cell Cardiol*. Volume 33, Number 6, p. A164.
4. **Vincent G**, Khairallah M, Bouchard B, Kelleher JK & Des Rosiers C. Metabolic phenotyping of the diseased heart using ^{13}C -substrates and *ex vivo* perfusion in the working mode. XVII World Congress of the International Society for Heart Research, Winnipeg, Manitoba, Canada, July 6-11, 2001. *J Mol Cell Cardiol*. Volume 33, Number 6, p. A180. -Prix du meilleur poster-
5. Poirier M, **Vincent G**, Kelleher JK & Des Rosiers C. The anaplerotic pyruvate/citrate pathway and its link to malonyl-CoA synthesis in the perfused rat heart. Experimental Biology 2001, Orlando, Florida, 2001.
6. Des Rosiers C, **Vincent G**, Poirier M, Laplante A & Comtois AS. Contrôle métabolique de l'homéostasie cardiaque : Rôle de la cataplérose du citrate et des canaux K^+_{ATP} . Congrès de l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (ACFAS). Ste-Foy, Québec, Canada, 2000.
7. Khairallah M, **Vincent G** & Des Rosiers C. Rôle du citrate cytosolique dans la régulation du métabolisme cardiaque chez des cœurs de rats SHR perfusés au travail. 3^e Journée Scientifique des Étudiants du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal, le 21 décembre 2000.
8. **Vincent G**, Comte B, Poirier M & Des Rosiers C. Evidence for citrate cataplerosis in perfused hearts: a signal of mitochondrial fuel abundance? Experimental Biology 1999, Washington, D.C. April 17-21, 1999. *Faseb J*. Volume 13, Number 5, Abstract number 599.9, p.A765. March 15, 1999.
9. Poirier M, Harvey D, Corbin M-P, **Vincent G** & Des Rosiers C. Citrate cataplerosis and its link to malonyl-CoA synthesis in the perfused rat heart. Experimental Biology 1999, Washington, D.C. April 17-21, 1999.
10. **Vincent G** & Des Rosiers C. Le rôle du citrate dans le métabolisme cardiaque: plus qu'un intermédiaire du cycle de Krebs. Concours Simon-Pierre Noël. Université de Montréal, le 3 mars 1999.

11. **Vincent G**, Comte B, Poirier M & Des Rosiers C. A ^{13}C -study of citrate release by the perfused rat heart: an index of mitochondrial fuel abundance?. XVI World Congress of the International Society for Heart Research, Rhodes, Grece, May 27-31, 1998. *J Mol Cell Cardiol*. Volume 30, Abstract number 232, p. A60.
12. Des Rosiers C, Laplante A, Brunet J, **Vincent G** & Comte B. La cardioprotection métabolique: Rôle des substrats exogènes et des canaux K^+_{ATP} . Association canadienne-française pour l'avancement des sciences (ACFAS). Ste-Foy, Québec, Canada, 1998.
13. **Vincent G**, Comte B, Poirier M & Des Rosiers C. Le rôle du citrate dans le métabolisme cardiaque: plus qu'un intermédiaire du cycle de Krebs. 1^{ère} Journée Scientifique des Étudiants du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Montréal, le 16 décembre 1998.
14. Brunet J, Laplante A, **Vincent G** & Des Rosiers C. Modulation du débit coronarien par le *N*-acétylcystéine (NAC) et les substrats énergétiques dans le cœur de rat reperfusés après 4h de préservation hypothermique. Club de Recherche Clinique du Québec, Trois-Rivières, Québec, 16-18 octobre 1997.
15. Brunet J, Laplante A, **Vincent G** & Des Rosiers C. *N*-acetylcysteine (NAC) and energy substrats (ES) modulated coronary flow but not contractile function of hearts reperfused after hypothermic preservation. 16th International Congress of Nutrition. Montreal, Québec, 27 juillet-1^{er} août 1997.
16. Brunet J, Laplante A, **Vincent G** & Des Rosiers C. Reperfusion of rat hearts preserved in Celsior solution : *N*-acetylcysteine (NAC) and energy substrats (ES) modulated coronary flow but not contractile function. Experimental Biology 97, New Orleans, L.A. April 6-9, 1997. *Faseb J*. Volume 11, Number 3, Abstract number 395, p.A68. February 28, 1997.
17. **Vincent G**, Comte B & Des Rosiers C. ^{13}C -Labeling of mitochondrial acetyl-CoA (Ac-CoA) in the perfused rat heart reflected by effluent citrate and ketone bodies (KB). Experimental Biology 97, New Orleans, L.A. April 6-9, 1997. *Faseb J*. Volume 11, Number 3, Abstract number 1564, p.A269. February 28, 1997.
18. Laplante A, **Vincent G** & Des Rosiers C. Pathways of succinate production in the perfused rat heart. Evidence for compartmentation using mass isotopomer analysis. American Society of Biochemistry and Molecular Biology, New Orleans, L.A., June 2-6, 1996.
19. Laplante A, **Vincent G** & Des Rosiers C. Production de succinate par le cœur perfusé de rat. Mise en évidence d'une compartimentation par l'analyse des isotopomères de masse. Concours Simon-Pierre Noël. Université de Montréal, le 29 février 1996.
20. Comte B, Jetté M, **Vincent G** & Des Rosiers C. Anaplerosis through pyruvate carboxylation in perfused rat heart: Measurements using mass isotopomer analysis of citrate. Annual Meeting of the American Heart Association, Anaheim, Ca., E.-U., 1995.

21. Laplante A, **Vincent G** & Des Rosiers C. Reversal of succinate dehydrogenase activity in normoxic and oxygen-deprived rat hearts. Flux measurements from mass isotopomer analysis of succinate. Annual Meeting of the Biomedical Engineering Society, Boston, Ma., E-U., October 6-8, 1995.
22. Comte B, Jetté M, **Vincent G** & Des Rosiers C. Anaplerosis through pyruvate carboxylation in perfused rat heart: Measurements using mass isotopomer analysis of citrate. Annual Meeting of the Biomedical Engineering Society, Boston, Ma., E.-U., October 6-8, 1995.

