



HAL
open science

Sensibilité du coeur à l'ischémie-reperfusion et stratégie de cardioprotection par l'exercice : rôle spécifique de la eNOS myocardique

Charlotte Farah

► To cite this version:

Charlotte Farah. Sensibilité du coeur à l'ischémie-reperfusion et stratégie de cardioprotection par l'exercice : rôle spécifique de la eNOS myocardique. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2012. Français. NNT : 2012AVIG0706 . tel-00870574

HAL Id: tel-00870574

<https://theses.hal.science/tel-00870574>

Submitted on 7 Oct 2013

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

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

UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE

Ecole doctorale AGROSCIENCES ET SCIENCES

THESE

Présentée par :

Charlotte FARAH

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR

Spécialité : **PHYSIOLOGIE**

**Sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion et stratégie
de cardioprotection par l'exercice : rôle spécifique de la
eNOS myocardique**

Soutenue le 06 décembre 2012

Membres du jury :

Mme. Stéphanie BARRERE-LEMAIRE, DR-CNRS à Montpellier	Rapporteur
Mme. Monique BERNARD, DR-CNRS à l'Université de Marseille	Rapporteur
Mme. Diane GODIN-RIBUOT, Professeur à l'Université de Grenoble	Examineur
Mme. Marina MARINI, Professeur associé à l'Université de Bologne	Examineur
M. Olivier CAZORLA, CR-CNRS à l'INSERM de Montpellier	Examineur
M. Cyril REBOUL, MCF-HDR à l'Université d'Avignon	Directeur de thèse
M. Stéphane TANGUY, MCF-HDR à l'Université de Grenoble	Co-Directeur de thèse

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	12
REVUE DE LITTÉRATURE.....	17
I. L'ISCHÉMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE.....	18
1. Généralités sur l'ischémie-reperfusion myocardique.....	18
1.1. L'ischémie.....	19
1.1.1. Conséquences métaboliques des altérations ioniques cellulaires associées à l'ischémie.....	19
1.2. La reperfusion.....	21
1.2.1. Stress oxydant et troubles de l'homéostasie calcique au cours de la reperfusion.....	22
1.2.2. Altérations mitochondriales au cours de la reperfusion.....	23
1.2.3. Les arythmies de reperfusion.....	24
1.2.4. Les altérations fonctionnelles de reperfusion ou « <i>myocardial stunning</i> ».....	25
1.2.5. Les dommages vasculaires de reperfusion ou phénomène de « <i>no reflow</i> ».....	26
1.2.6. La mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion.....	27
a. La nécrose.....	27
b. L'apoptose.....	28
c. L'autophagie.....	29
1.3. Sources de stress oxydant dans le cœur.....	29
1.3.1. Facteurs pro-oxydants : les radicaux libres dérivés de l'oxygène.....	30
1.3.2. Sources de radicaux libres au cours de l'ischémie-reperfusion.....	31
a. La chaîne respiratoire mitochondriale.....	31
b. La NADPH oxydase.....	32
c. La voie de la xanthine oxydase (XO).....	32
d. Les nitrique oxyde synthétases (NOS).....	33
1.3.3. Les facteurs antioxydants.....	33
a. La superoxyde dismutase (SOD).....	34
b. La glutathion peroxydase (GPx).....	34
c. La catalase (CAT).....	34

2. Le rôle du NO et de la eNOS dans l'ischémie-reperfusion myocardique	36
2.1. Généralités sur le NO et les NOS.....	36
2.2. Synthèse du NO par la eNOS et régulation de la eNOS.....	38
2.2.1. Synthèse du NO par la eNOS.....	38
2.2.2. Découplage de la eNOS.....	41
2.2.3. Régulation de l'activité de la eNOS.....	43
a. Régulation transcriptionnelle.....	43
b. Régulation post-transcriptionnelle.....	43
2.3. NO et fonctions cardiovasculaires.....	48
2.3.1. NO et fonction vasculaire.....	49
2.3.2. NO et fonction cardiaque.....	49
a. Voie GMPc-dépendante.....	50
b. S-nitrosylation.....	52
c. NO et mitochondrie.....	53
2.4. NO et ischémie-reperfusion myocardique.....	54
2.4.1. Effets bénéfiques du NO au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique.....	55
a. Effets cardioprotecteurs du NO sur la fonction mitochondriale.....	56
b. S-nitrosylation et cardioprotection.....	57
2.4.2. Effets délétères du NO au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique.....	58
2.4.3. eNOS et ischémie-reperfusion myocardique.....	59
a. Découplage de la eNOS, ONOO ⁻ et ischémie-reperfusion myocardique.....	60
b. BH ₄ et ischémie-reperfusion myocardique.....	61
 II. EXERCICE ET CARDIOPROTECTION	 63
1. Effets de l'exercice sur le cœur	64
1.1. Effets de l'exercice sur la contractilité myocardique et l'homéostasie calcique.....	64
1.2. Effets de l'exercice sur la eNOS.....	65
1.3. Effets de l'exercice sur le statut antioxydant myocardique.....	67
2. Effets cardioprotecteurs de l'exercice	68

2.1. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle de la perfusion myocardique	69
2.2. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle du statut enzymatique antioxydant myocardique	69
2.3. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle de l'homéostasie calcique	71
2.4. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle de la eNOS myocardique	72
2.5. Autres facteurs	74
2.5.1. Les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K_{ATP} channels)	74
2.5.2. La mitochondrie	74
Objectifs du travail de thèse	76
MATÉRIELS ET MÉTHODES	80
I. POPULATIONS	83
1. Etude n°1	83
1.1. Exposition au CO	83
1.2. Protocole d'entraînement	84
2. Etudes n°2 et n°3	86
2.1. Protocole d'entraînement	86
3. Etude n°4	86
II. ISCHÉMIE-REPERFUSION SUR CŒUR ISOLÉ	87
1. Cœur isolé-perfusé de Langendorff et pharmacologie	87
1.1. Etude n°1	88
1.2. Etudes n°2 et n°3	88
1.3. Etude n°4	89
2. Evaluation des paramètres fonctionnels au cours de l'IR	91
3. Evaluation de la taille d'infarctus	92
4. Evaluation des arythmies de reperfusion (étude n°1)	93
III. ÉTUDE DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION SUR CARDIOMYOCYTES ISOLÉS	95
1. Isolement des cardiomyocytes	95
2. Evaluation du raccourcissement cellulaire et imagerie calcique	96
2.1. Principe	96
2.2. Protocole	97
IV. BIOCHIMIE	99

1. Capacité antioxydante myocardique	99
1.1. Capacité enzymatique antioxydante myocardique (étude n°1).....	99
1.1.1. Evaluation de l'activité de la SOD.....	100
1.1.2. Evaluation de l'activité de la CAT.....	100
1.1.3. Evaluation de l'activité de la GPx.....	100
1.2. Capacité antioxydante myocardique totale (études n°2 et n°3).....	101
1.2.1. Préparation des échantillons.....	101
1.2.2. Evaluation de la puissance antioxydante myocardique.....	101
2. Activité de la LDH dans les effluents coronaires au cours de l'IR (étude n°1)	102
3. Production de NO dans les effluents coronaires au cours de l'IR (études n°2 et n°3)	102
4. Western blots	103
4.1. Extraction et préparation des échantillons.....	103
4.2. Dosages des protéines.....	103
4.3. Western immunoblotting.....	104
5. Evaluation de la peroxydation lipidique par dot blot	105
6. Evaluation du stress oxydant myocardique par résonance paramagnétique électronique (RPE)	106
6.1. Extraction et préparation des échantillons.....	106
6.2. Mesures par RPE.....	106
6.2.1. Principe de la RPE et du « <i>spin trapping</i> ».....	106
6.2.2. Protocole.....	107
V. TRAITEMENT STATISTIQUE	109
 RESULTATS	 110
 ETUDE n° 1	 111
I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs	112
II. Résultats	114
1. Effets de l'exercice sur le développement d'un phénotype pathologique myocardique induit par l'exposition au CO	114
1.1. Homéostasie calcique et contractilité cardiomyocytaire.....	114

1.2. Statut enzymatique antioxydant myocardique.....	118
2. Effets de l'exercice sur l'aggravation de la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR induite par l'exposition au CO	120
2.1. Les arythmies de reperfusion.....	120
2.2. La mort cellulaire.....	122
III. Bilan de cette étude.....	124
ETUDE n° 2.....	125
I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs	126
II. Résultats.....	127
1. Expressions des NOS et régulation post-transcriptionnelle de la eNOS : impacts de l'exercice	127
2. Modulation de la sensibilité du cœur à l'IR par l'exercice : rôle de la eNOS	130
2.1. La fonction myocardique.....	130
2.2. Débit coronarien.....	133
2.3. Taille de la zone infarctée.....	134
3. Effets de l'exercice sur la régulation post-transcriptionnelle de la eNOS au cours de l'IR.....	135
3.1. Statut antioxydant myocardique	135
3.2. Niveau de phosphorylation (Ser ¹¹⁷⁷) de la eNOS au cours de l'IR.....	136
3.3. Etat de couplage de la eNOS au cours de l'IR.....	137
III. Bilan de cette étude.....	139
ETUDE n° 3.....	140
I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs	141
II. Résultats.....	142
1. Effets de la perfusion de BH ₄ sur le couplage de la eNOS.....	142
2. Implication du découplage de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice.....	143
2.1. La fonction myocardique.....	143

2.2. Le débit coronarien.....	146
2.3. Taille de la zone.....	146
2.4. Effets de la perfusion de BH ₄ réalisée lors des 5 premières minutes de reperfusion sur la cardioprotection par l'exercice.....	147
3. Productions de NO et d'O₂⁻ par la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion.....	151
3.1. Production de NO.....	151
3.2. Production d'O ₂ ⁻ dépendante de la NOS.....	152
4. Effets de l'exercice sur le stress nitro-oxydant au cours des premières minutes de reperfusion.....	154
4.1. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	154
4.2. Evaluation de la nitrotyrosination myocardique.....	155
III. Bilan de cette étude.....	157
ETUDE n° 4.....	158
I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs.....	159
II. Résultats.....	160
1. Effets de l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} sur la sensibilité du myocarde à l'IR.....	160
1.1. Effet de l'injection d'EPI sur la eNOS-P ^{Ser1177}	160
1.2. Phosphorylation pharmacologique de eNOS et sensibilité du cœur à l'IR.....	161
2. Régulation post-transcriptionnelle de la eNOS au cours de la reperfusion : impact de l'augmentation pharmacologique de eNOS-P^{Ser1177}.....	162
III. Bilan de cette étude.....	164
DISCUSSION.....	165
I. Prévention par l'exercice du développement d'un phénotype pathologique : rôle dans la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion.....	166

II. Rôle de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice	169
III. Conclusion	176
PERSPECTIVES	179
BIBLIOGRAPHIE	182
Liste des figures et tableaux	207
ANNEXES	216
1. Article n°1	217
2. Article n°2	224

Liste des principales abréviations

Akt : protéine kinase B

ATP : adénosine triphosphate

β-AR : β-adrénergique

BH₄ : tétrahydrobioptérine

BH₂ : dihydrobioptérine

Ca²⁺ : calcium

[Ca²⁺]_i : concentration intracellulaire en Ca²⁺

CAT : catalase

CEC : couplage excitation-contraction

CMH : 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl-pyrrolidine

CO : monoxyde de carbone

DHFR : dihydrofolate reductase

dP/dt max : indice de contractilité myocardique

dP/dt min : indice de relaxation myocardique

eNOS : nitrique oxyde synthétase endothéliale

EPI : épinéphrine

FV : fibrillation ventriculaire

GCH-1 : GTP cyclohydrolase-1

GCs : guanylate cyclase soluble

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GPx : glutathion peroxydase

iNOS : nitrique oxyde synthétase inductible

IR : ischémie-reperfusion

LDH : lactate déshydrogénase

L-NAME : N-nitro-L-arginine méthylester

MDA : malondialdéhyde

Na⁺ : sodium

nNOS : nitrique oxyde synthétase neuronale

NO : monoxyde d'azote

NOS : nitrique oxyde synthétase

O₂ : oxygène

O₂⁻ : anion superoxyde

OMS : organisation mondiale de la santé

ONOO⁻ : peroxydinitrite

Pdev : pression développée

Pdiast : pression diastolique

Pi3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PKG : protéine kinase G

Psyst : pression systolique

RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène

RS : reticulum sarcoplasmique

RyR-2 : récepteur à la ryanodine

SERCA-2a : pompe Ca²⁺-ATPase du reticulum sarco/endoplasmic

Ser : résidu sérine

SOD : superoxyde dismutase

TAP : *total antioxidant power*

TTC : triphenyl-tétrazolium chloride

VD : ventricule droit

VG : ventricule gauche

VMA : vitesse maximale aérobie

ZI : zone infarctie

Introduction générale

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les pathologies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés et demeurent en France la seconde cause de décès, devancée par le cancer. La plus meurtrière de ces pathologies est l'infarctus du myocarde. En France, 120 000 infarctus du myocarde sont recensés chaque année, dont 40 000 sont mortels. Ainsi, bien que le nombre de décès lié à ce type d'accident ischémique aigu ait été divisé par 3 en 15 ans (Puymirat *et al.*, 2012), il n'en demeure pas moins une priorité de santé publique. L'infarctus du myocarde se définit comme le manque d'apports en oxygène (O_2) et nutriments aux cellules du cœur, aboutissant à une destruction du tissu cardiaque. Il résulte d'une obstruction partielle ou totale d'une partie du réseau artériel coronaire, alors responsable de l'ischémie du muscle cardiaque. Dès lors, la seule intervention possible est la reperfusion des tissus ischémisés. Bien que la reperfusion ait fait l'objet de nombreuses avancées thérapeutiques pharmacologiques et chirurgicales, celle-ci est à l'origine de nombreux dommages tissulaires qui lui sont propres, regroupés sous le terme de « lésions de reperfusion » (Garlick *et al.*, 1987; Fliss & Gattinger, 1996 ; Murphy & Steenbergen, 2008).

La sévérité des lésions de reperfusion résulte d'une interaction complexe entre facteurs génétiques et environnementaux. En effet, certains facteurs environnementaux, tels que notamment la pollution et l'exercice, peuvent être à l'origine d'un remodelage phénotypique myocardique ayant pour conséquence une modulation de la sensibilité de l'organe à l'ischémie-reperfusion (IR). Ainsi, il a récemment été montré que la pollution atmosphérique au monoxyde de carbone (CO), un polluant fréquemment rencontré en environnement urbain (Samoli *et al.*, 2007), était à l'origine d'un remodelage phénotypique du cœur caractérisé par une altération du statut redox (André *et al.*, 2011 ; Reboul *et al.*, 2012) et de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire (Bye *et al.*, 2008 ; André *et al.*, 2010). Ces modifications phénotypiques sont à l'origine, dans un tel modèle d'exposition citadine au CO, d'une plus grande vulnérabilité du myocarde au stress d'IR (Meyer *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la pratique régulière d'exercice physique (entraînement) est aujourd'hui très largement considérée comme une stratégie thérapeutique permettant de préserver l'intégrité du muscle cardiaque lors d'un phénomène d'IR (Powers *et al.*, 2008). En effet, les effets bénéfiques d'une pratique régulière non épuisante d'exercice physique sur la santé cardiovasculaire ont été largement décrits (Warburton *et al.*, 2006 ; Ignarro *et al.*, 2007), et désormais une telle pratique fait partie des recommandations de l'OMS. Dans le cadre de l'infarctus du myocarde, de nombreuses études ont ainsi rapporté une diminution de la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR avec la pratique préventive d'exercices en endurance (Ascensão *et al.*, 2007 ; Powers *et al.*, 2008). Malgré tout le potentiel thérapeutique d'une telle stratégie, à ce jour, les mécanismes biologiques associés à la cardioprotection par l'exercice n'ont été que peu investigués. Il semble néanmoins se dégager un consensus sur le rôle essentiel de l'amélioration du statut enzymatique antioxydant myocardique (Powers *et al.*, 1998, Hamilton *et al.*, 2003 ; French *et al.*, 2008), et du maintien de l'homéostasie calcique cellulaire au cours de l'IR (French *et al.*, 2006 & 2008 ; Wisloff *et al.*, 2002) dans ce type de cardioprotection.

Ainsi, le premier objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer i) les effets potentiellement protecteurs d'un exercice chronique en endurance sur le développement d'un phénotype pathologique associé à une exposition prolongée au CO, et ii) comment cette stratégie, visant à prévenir le remodelage cellulaire associé à l'exposition au CO, contribue à normaliser/réduire la vulnérabilité du myocarde au syndrome d'IR (**étude n°1**).

Parmi les cibles moléculaires pouvant jouer un rôle dans la modulation de la sévérité des lésions de reperfusion post-ischémique, la nitrique oxyde synthétase endothéliale (eNOS) a émergé depuis la fin des années 90. La eNOS est une enzyme exprimée de manière constitutive dans le système cardiovasculaire, qui à l'état physiologique est fonctionnelle

sous forme d'homodimère, état dit « couplé », et est alors responsable de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) à partir de L-arginine et d'O₂. Bien que le rôle de la eNOS dans la régulation de l'homéostasie cardiomyocytaire ne soit que partiellement élucidé et reste à ce jour encore controversé, les effets du NO dans la régulation de la contractilité myocardique (Massion *et al.*, 2003 ; Shah & Mac Carthy, 2000) et des flux calciques lors du couplage excitation-contraction sont largement rapportés (Hare, 2003 ; Seddon *et al.*, 2007). En condition de stress, notamment pathologique, tel que rencontré lors de l'IR myocardique, un découplage de la eNOS peut avoir lieu et celle-ci, alors sous forme de monomère, état dit « découplé », ne produit plus de NO mais de l'anion superoxyde (O₂⁻) (Xia, 2007). De plus, le NO et l'O₂⁻ ainsi formés peuvent réagir ensemble et produire le très cytotoxique peroxy-nitrite (ONOO⁻) (Pacher *et al.*, 2007). Au cours de l'IR, ce phénomène de découplage de la eNOS, et la production de ONOO⁻ associée, ont clairement été impliqués dans la sévérité des lésions de reperfusion et l'aggravation de la vulnérabilité du myocarde à l'IR (Wang *et al.*, 1996 ; Yasmin *et al.*, 1997 ; Zweier *et al.*, 2001 ; Carnicer *et al.*, 2012). Dans ce contexte, de multiples études ont mis en évidence une réduction de la sensibilité cardiaque à l'IR avec une stimulation de la voie de synthèse de NO par la eNOS (Brunner *et al.*, 2003 ; Elrod *et al.*, 2006 ; Frantz *et al.*, 2009 ; Aragon *et al.*, 2011) et/ou par un maintien de l'état fonctionnel couplé de la eNOS, notamment par l'administration de BH₄ (Verma *et al.*, 2002 ; Yamashiro *et al.*, 2002 ; Tienfenbacher *et al.*, 2003).

D'autre part, la eNOS est considérée comme une cible privilégiée des adaptations à l'exercice en endurance. En effet, de nombreuses études ont rapporté une augmentation de l'expression de la eNOS (Sessa *et al.*, 1994 ; Mc Allister *et al.*, 2008 ; Balligand *et al.*, 2009) et/ou de son activation par phosphorylation (résidu sérine 1177 ; eNOS-P^{Ser1177}) (Hambrecht *et al.*, 2003 ; Lauer *et al.*, 2005 ; Zang *et al.*, 2009) avec l'exercice. De manière surprenante, en dépit de la reconnaissance du rôle clef de la eNOS dans la modulation des lésions de reperfusion, jusque très récemment, aucune étude ne s'était intéressée au rôle de la eNOS dans les effets bénéfiques de l'exercice sur la sensibilité du cœur à l'IR. Ce n'est

qu'en 2011 que Calvert *et al.* (2011) ont démontré le rôle majeur de l'augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177} dans la cardioprotection par l'exercice. Néanmoins, dans cette étude, comment l'exercice influence la modulation de l'état d'activation de la eNOS au cours de l'ischémie et de la reperfusion n'a pas été abordé et reste à ce jour méconnu.

Dans ce travail, nous nous sommes donc intéressés à investiguer les effets de l'exercice sur la eNOS au cours de l'ischémie et de la reperfusion, en portant un intérêt particulier sur les variations de son état de phosphorylation et de dimérisation.

Ainsi, le second objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer i) les effets de l'exercice sur la modulation de l'état fonctionnel de la eNOS au cours de l'IR (**étude n°2**), ii) l'impact de ces modulations sur le stress nitro-oxydant au cours de l'IR (**étude n°3**) et enfin, iii) le lien potentiel entre l'activation catécholaminergique de la eNOS et sa modulation au cours de l'IR (**étude n°4**).

Revue de littérature

I. L'ISCHEMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE

1. Généralités sur l'ischémie-reperfusion myocardique

L'ischémie myocardique se définit comme le déséquilibre entre les besoins en O₂ et en nutriments du tissu myocardique et leurs apports par la circulation coronaire. Dans le cadre de l'infarctus du myocarde, l'ischémie résulte d'une obstruction partielle ou totale d'une partie du réseau artériel coronaire, liée au rétrécissement par sténose du calibre de ces vaisseaux ou à leur occlusion par un thrombus ou une plaque d'athérome. L'occurrence et la gravité des altérations cellulaires du tissu ischémié sont directement dépendantes de l'étendue de la zone ischémiée ainsi que de l'importance et de la durée de la réduction du flux sanguin, déterminant ainsi la sévérité de l'infarctus. La seule intervention efficace permettant de réduire la sévérité de l'infarctus est la reperfusion coronaire de la zone ischémiée.

Depuis plus de deux décennies, cette unique méthode thérapeutique fait ainsi l'objet de recherches en matière de développement de techniques permettant l'optimisation de la reperfusion myocardique post-ischémie (Ivanov *et al.*, 2010 ; Braunwald, 2011 ; pour revues). Les méthodes aujourd'hui employées sont la dissolution chimique des thromboses occlusives, l'administration de médicaments vasodilatateurs, l'angioplastie, la cathétérisation, et la chirurgie (pontage artériel). Néanmoins, bien qu'elle soit indispensable à la survie du myocarde, la reperfusion et la ré-oxygénation qui l'accompagne sont responsables de nombreux dommages tissulaires qui lui sont propres, regroupés sous le terme de « lésions de reperfusion » (ou « *reperfusion injuries* »). La reperfusion myocardique post-ischémie a ainsi été qualifiée « d'épée à double tranchant » (Jennings & Reimer, 1983), faisant d'elle une cible clef dans le développement de stratégies de cardioprotection.

1.1. L'ischémie

L'ischémie myocardique est un processus dynamique dont la gravité des lésions générées dépend de la durée et de la sévérité de l'ischémie (Reimer *et al.*, 1977 ; Palmer *et al.*, 2004). Il est ainsi possible de distinguer les ischémies dites de courtes durées, responsables de lésions myocardiques ischémiques réversibles, des ischémies prolongées dont les lésions sont irréversibles. En deçà d'une quinzaine de minutes d'ischémie, les dommages cellulaires sont considérés comme totalement réversibles puisque la reperfusion coronaire permet de recouvrer un métabolisme et une fonction normale, sans apparition de nécrose cardiomyocytaire (Jennings & Reimer, 1983). A l'inverse, si l'ischémie est prolongée au-delà de 15-20 minutes, une partie du tissu myocardique peut être irréversiblement lésé. Ces lésions sont notamment caractérisées à l'échelle tissulaire par la présence d'inclusions intramitochondriales denses et des ruptures membranaires pouvant mener à la fuite de composants cellulaires et à une anarchie architecturale (Allen & Orchard, 1987). La nécrose associée à l'agression ischémique est alors d'autant plus importante que la durée de l'ischémie est maintenue, s'étendant progressivement de l'endocarde vers l'épicarde (Jennings *et al.*, 1960 ; Reimer & Jennings 1979). Par ailleurs au niveau cellulaire, la restriction d'apports en nutriments et O₂ induite par l'ischémie est responsable de modifications métaboliques et d'altérations ioniques principalement responsables d'une surcharge calcique (Lubbe & Opie, 1988 ; Steenbergen *et al.*, 1990 ; 1993).

1.1.1. Conséquences métaboliques et altérations ioniques cellulaires associées à l'ischémie

En condition physiologique, lorsque le flux sanguin coronaire assure un apport adéquat en O₂ et nutriments aux tissus cardiaques, la synthèse d'ATP requise pour l'activité contractile du myocarde est essentiellement dépendante du métabolisme oxydatif. Mais en condition ischémique, l'apport en O₂ devient insuffisant ; la production d'ATP est alors

assurée par la glycolyse anaérobie. Cette voie métabolique est responsable d'une déplétion myocardique en ATP due à sa faible rentabilité, et d'autre part induit une production massive de protons (H^+) à l'origine d'une acidose cellulaire (Opie, 1990; Allen & Orchard, 1987). Afin de restaurer le pH, l'échangeur Na^+/H^+ (isoforme NHE-1 pour les myocytes cardiaques) est activé, permettant ainsi l'élimination des H^+ en excès mais provoquant un important flux entrant de Na^+ (Pike *et al.*, 1993). Par ailleurs, la déplétion en ATP réduit l'activité des pompes Na^+/K^+ ATPase, favorisant ainsi l'accumulation des Na^+ intracellulaires. La réduction du gradient transmembranaire sodique a pour conséquence l'activation en « mode inversé » de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} (NCX), ainsi responsable d'une surcharge calcique intracellulaire (Allen & Orchard, 1987). Cette activité inversée des NCX semble être la cause principale de la surcharge calcique générée au cours de l'ischémie (Imahashi *et al.*, 2005), mais il est à noter que celle-ci est renforcée par l'inactivation des pompes Ca^{2+} ATP-dépendantes normalement responsables de la diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ (Talukder *et al.*, 2009 ; pour revue) (Fig. I.1).

Dans de telles conditions de déplétion en ATP, d'acidose et de surcharge calcique, l'activité contractile cardiaque est fortement altérée et la survie du myocarde dépend de la survenue de la reperfusion.

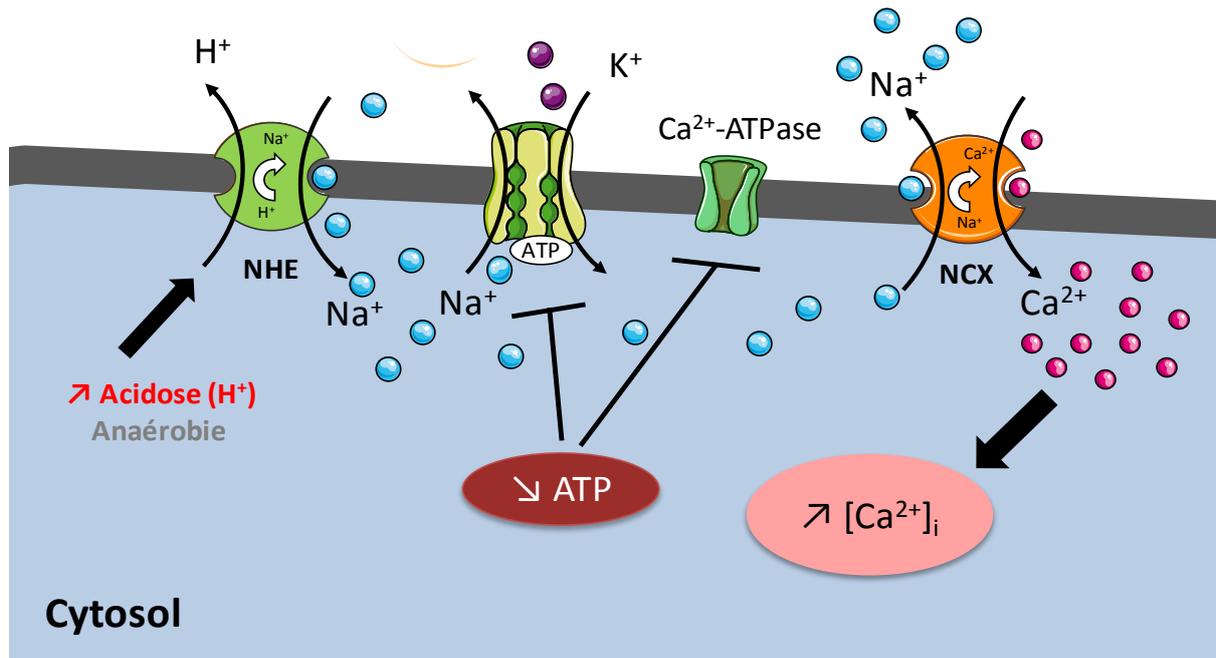


Figure I.1 : Altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours de l'ischémie. NHE : échangeur Na^+/H^+ ; Ca^{2+} -ATPase : pompe calcique dépendante de l'ATP ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.
Adapté de la thèse de G.Meyer, 2010.

1.2. La reperfusion

La reperfusion coronaire est reconnue comme étant le seul moyen de sauver le myocarde ischémié. Cependant, de nombreuses études tant cliniques (Willerson & Buja, 1990 ; Iwakura *et al.*, 1995 ; Sheiban *et al.*, 1997 ; Ivanov *et al.*, 2010) qu'expérimentales (Mannings & Hearse, 1984 ; Fliss & Gattlinger, 1996 ; Wang & Zweier, 1996) ont mis en évidence que la reperfusion s'accompagne d'effets délétères propres, et d'une accélération du processus de mort cellulaire initié par l'ischémie, aboutissant au concept de « syndrome de reperfusion ». La ré-oxygénation brutale et rapide (ou « *burst* » d' O_2) permise par la restauration du flux sanguin est responsable d'une production massive de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) impliqués de manière majeure dans l'aggravation de la surcharge calcique amorcée en période ischémique, ainsi que dans l'apparition des lésions de reperfusion. Ces dernières sont de 4 types : les arythmies de reperfusion, les altérations

fonctionnelles (sidération myocardique ou « *myocardial stunning* »), les dommages vasculaires (altérations de perfusion ou phénomène de « *no reflow* »), la mort cellulaire (nécrose, apoptose et autophagie).

1.2.1. Stress oxydant et troubles de l'homéostasie calcique au cours de la reperfusion

Au moment de la reperfusion, la remise en fonction du système énergétique cellulaire aérobie va permettre la remise en activité des canaux ATP-dépendant et favoriser l'extrusion du Ca^{2+} intracellulaire. Néanmoins, l'apport soudain d' O_2 survenant lors de la reperfusion conduit à la formation en excès de RLO, responsables d'un stress oxydatif sévère impliqué dans de nombreuses altérations cellulaires (Garlick *et al.*, 1987 ; Zweier *et al.*, 1987 ; Zweier & Talukder, 2006). Hearse introduit ainsi, en 1978, le concept de «paradoxe de l'oxygène » (Hearse *et al.*, 1978), désignant la confrontation inévitable entre la nécessité d'apports en O_2 pour la survie cellulaire et la production délétère de RLO liée à cette apport, et dont vont résulter les lésions cellulaires de stress oxydant. Les RLO désignent des espèces chimiques oxygénées rendues très réactives par la présence d'un électron non apparié. La production excessive de RLO au cours des premières minutes de reperfusion est responsable d'oxydation protéique, de dommages de l'ADN et de peroxydation lipidique. Parmi les nombreuses cibles cellulaires des RLO, les protéines responsables de l'homéostasie calcique cellulaire au niveau membranaire (Dixon *et al.*, 1990) et du réticulum sarcoplasmique (RS) sont fortement atteintes (Bolli & Marban, 1999 ; Zima & Blatter, 2006). Notamment, l'oxydation des pompes Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco/endoplasmic (SERCA-2a) (Kuster *et al.*, 2010), responsables de la re-séquestration calcique dans le RS en phase de diastole, conduit à une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La production de RLO au cours de la reperfusion est ainsi associée à une aggravation de la surcharge calcique intracellulaire induisant notamment à une réduction de l'amplitude du transitoire calcique. De plus, cette surcharge calcique, en activant la CaMKII (*Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II*), est

responsable d'une hyperphosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR-2) à l'origine d'une augmentation des fuites de Ca^{2+} du RS, contribuant ainsi à augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en diastole (Ai *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ va favoriser la surcharge en Ca^{2+} de la matrice mitochondriale, menant à de graves altérations fonctionnelles de l'organe et ainsi à de sévères troubles fonctionnels cardiomyocytaires (Fig. 1.2).

1.2.2. *Altérations mitochondriales au cours de la reperfusion*

La production massive de RLO, associée à la surcharge calcique cytosolique au cours de la reperfusion, a été démontrée comme responsable d'altérations de la fonction mitochondriale particulièrement critiques dans la genèse des lésions de reperfusion (Borutaite *et al.*, 1999 ; Weiss *et al.*, 2003 ; Di Lisa & Bernardi, 2006). Parmi celles-ci, l'ouverture du mégapore de perméabilité transitoire (mPTP pour « *mitochondrial Permeability Transition Pore* ») est largement rapportée comme étant la plus délétère (Di Lisa *et al.*, 2003 ; Weiss *et al.*, 2003). Le mPTP est un méga canal voltage-dépendant situé sur la membrane interne mitochondriale permettant la diffusion passive de solutés et molécules de tailles inférieures à 1.5 kDA, inhibé par la cyclosporine A et activé par le Ca^{2+} (Bernardi, 1999). Ainsi, la surcharge calcique observée au cours de l'IR conduit à l'ouverture du mPTP et donc à une perte de la perméabilité sélective de la membrane mitochondriale. Ce phénomène est principalement à l'origine d'un effondrement du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$), menant à une disruption de la mitochondrie (« *mitochondrial swelling* »). Il résulte principalement de cette sévère altération i) une déplétion de la synthèse d'ATP, aggravant les troubles cellulaires générés en ischémie et pouvant aboutir à la nécrose cellulaire (Murphy & Steenbergen, 2008 ; pour revue), et ii) une libération de différents facteurs pro-apoptotiques, dont les 2 plus importants sont le cytochrome c et l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (Joza *et al.*, 2001 ; Borutaite *et al.*, 2003). Par ailleurs, le *burst* d' O_2 au cours de la reperfusion mène à une production massive de RLO par la chaîne de

transports des électrons, faisant de la mitochondrie la première source de radicaux libres au cours de l'IR.

Ainsi, il apparait une interdépendance importante entre les deux principaux mécanismes responsables du syndrome d'IR que sont la surcharge calcique des cardiomyocytes et la surproduction de RLO (Fig.1.2).

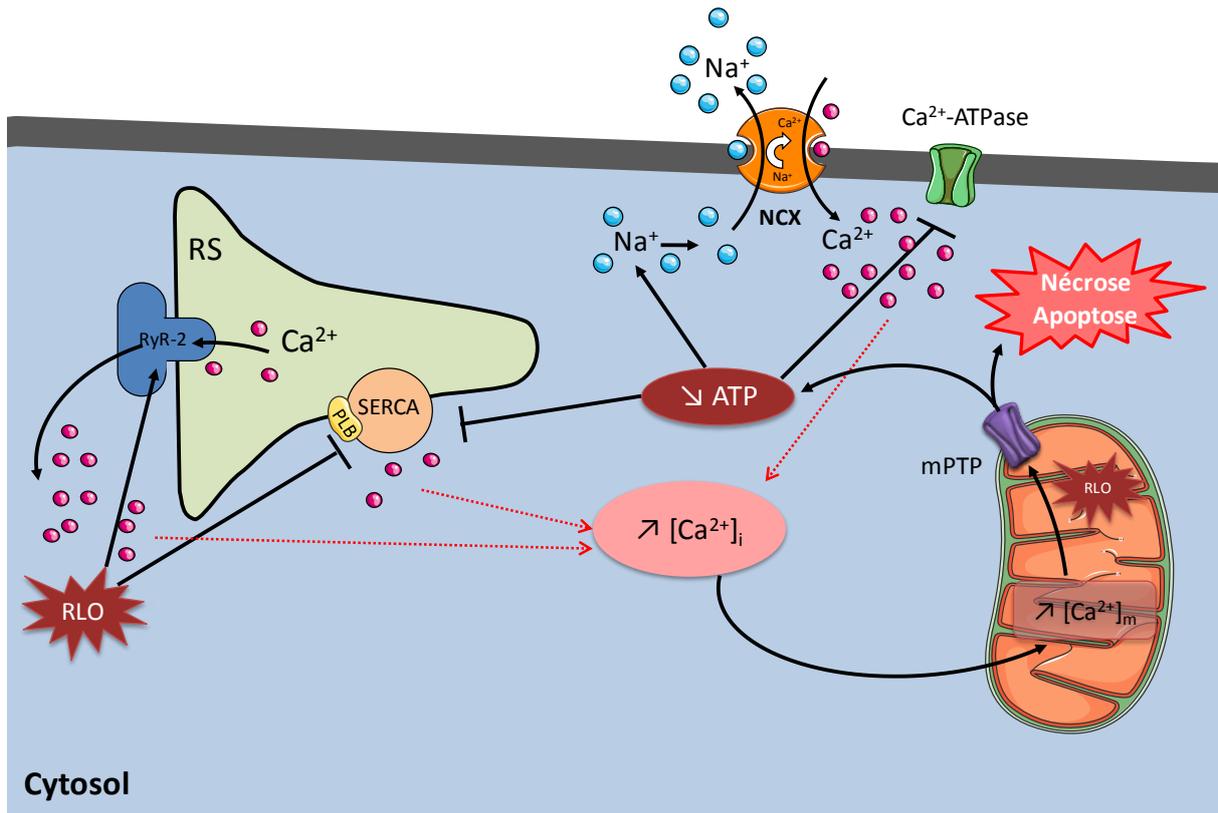


Figure 1.2 : Effets de la surcharge calcique et du stress oxydant dans les troubles de la reperfusion myocardique. RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase ; NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺. mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale.

Adapté de la thèse de G.Meyer, 2010.

1.2.3. *Les arythmies de reperfusion*

Les arythmies de reperfusion ont été observées dès les premières études menées sur l'IR myocardique (Tennant, 1936). Elles apparaissent de manière précoce dès les premières

secondes de reperfusion et sont de gravité plus ou moins sévère, allant de simples extrasystoles au déclenchement de fibrillations ventriculaires irréversibles (Mannings & Hearse, 1984). Parmi les nombreux facteurs évoqués dans l'occurrence de ces arythmies cardiaques, un consensus existe sur l'implication de dommages membranaires et de déséquilibres ioniques menant à des anomalies d'excitabilité cellulaire et/ou de conduction électrique (Laurita & Rosenbaum, 2008 ; pour revue). Dans le cadre de l'IR, ces modifications électrophysiologiques sont d'une part générées par la peroxydation lipidique des membranes par les RLO au cours des premières minutes de reperfusion (Manning *et al.*, 1984), et d'autre part liées aux désordres ioniques et à la surcharge calcique ischémique (Opie *et al.*, 1979, Corr & Witkowsky, 1983 ; Ter Keurs & Boyden, 2007). De plus, l'hétérogénéité tissulaire rencontrée à la frontière entre la zone saine et la zone ischémisée favorise la survenue de ces arythmies. En effet, l'hétérogénéité spatiale de repolarisation cellulaire entre les cellules ischémisées, dont l'homéostasie calcique est altérée, et les cellules saines, favorise des altérations de conduction des potentiels d'actions et l'apparition de courant excitateurs ré-entrants à l'origine d'arythmies cardiaques (Wilson & Rosenbaum, 2007 ; pour revue).

1.2.4. Les altérations fonctionnelles de reperfusion ou « myocardial stunning »

La dysfonction contractile ventriculaire post-ischémique, ou « *myocardial stunning* », ou « sidération myocardique », se définit par la dysfonction mécanique ventriculaire qui persiste suite à la reperfusion myocardique, malgré l'absence de dommages irréversibles. Cette sidération myocardique est donc un phénomène totalement réversible. Elle a été décrite pour la première fois sur un modèle expérimental d'IR en 1975 par Heyndrickx *et al.* (Heyndrickx *et al.*, 1975) mais n'a été dénommée « *stunning* » qu'en 1982 par Braunwald & Kloner (Braunwald & Kloner, 1982). Parmi les nombreux mécanismes responsables de cette sidération myocardique proposés dans la littérature scientifique, les plus reconnus sont : i) la

surcharge calcique, en lien avec l'altération du couplage excitation-contraction (CEC) des cardiomyocytes et ii) la production de RLO (Bolli & Marban, 1999). En effet, la diminution de la charge en Ca^{2+} du RS et l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique sont responsables d'une réduction de l'amplitude du transitoire calcique, facteur clef du CEC myocytaire, à l'origine d'une altération de la contraction des cardiomyocytes (Krause *et al.*, 1989 ; Valverde *et al.*, 2010). Par ailleurs, en plus d'être impliqués dans l'altération des protéines chargées de l'homéostasie calcique cellulaire, les RLO produits en début de reperfusion ont également pour cible les protéines contractiles. L'oxydation des myofilaments est à l'origine d'une altération de la contractilité cardiomyocytaire, notamment expliquée par une diminution de la sensibilité de la machinerie contractile au Ca^{2+} (Gao *et al.*, 1995). La dissipation de ces altérations de contractilité ventriculaire post-ischémiques peut nécessiter un délai allant de quelques heures à plusieurs jours selon la sévérité de l'ischémie.

1.2.5. Les dommages vasculaires de reperfusion ou phénomène de « no reflow »

Le phénomène de « no-reflow » se définit par l'absence de reperfusion myocardique post-ischémique survenant malgré la désobstruction de l'artère coronaire responsable de l'ischémie. Ce phénomène a été décrit pour la première fois sur un modèle expérimental en 1966 par Krug *et al.* (Krug *et al.*, 1966), puis a été plus amplement défini par Kloner *et al.* en 1974 (Kloner *et al.*, 1974). C'est en 1985 qu'il a été rapporté cliniquement par Schofer *et al.* (Schofer *et al.*, 1985). Dans le cadre de l'IR, la restauration du flux sanguin ne s'accompagne pas systématiquement d'une reperfusion au niveau de la microcirculation du territoire ischémié. Cette obstruction peut s'expliquer en termes de dommages « anatomiques » ou « structuraux » par la présence d'un œdème cellulaire comprimant les micro-vaisseaux. De plus, l'afflux brutal de débris plaquettaires et/ou thrombotiques provenant du traitement de l'ischémie par thrombolyse peut être à l'origine d'une obstruction de la microcirculation distale (Mizote *et al.*, 2005 ; Mauri *et al.*, 2006). D'un point de vue fonctionnel, le phénomène

de « *no-reflow* » résulte principalement d'une altération de la fonction endothéliale des microvaisseaux liée à la production de RLO par les neutrophiles circulants ainsi que par les cellules endothéliales elles-mêmes (Schwartz & Kloner, 2012 ; pour revue). L'altération de la fonction endothéliale lors de l'IR est responsable d'une réduction de libération de NO par les vaisseaux coronaires. La moindre biodisponibilité en NO vasculaire, qui est le principal agent vasodilatateur et un puissant anti agrégeant plaquettaire (Kubes *et al.*, 1991 ; Moncada *et al.*, 1991), contribue à augmenter l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire et ainsi favorise l'aggravation du phénomène de « *no reflow* » (Ma *et al.*, 1993). Prévenir et/ou limiter ces altérations vasculaires de reperfusion revêt une importance clinique majeure dans le traitement de l'IR et constitue donc un élément clef dans les stratégies de cardioprotection (Butler *et al.*, 2011 ; pour revue).

1.2.6. La mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion

La mort cellulaire observée au cours du syndrome d'IR est dépendante de la sévérité et de la durée de l'ischémie. Elle détermine directement la taille de la zone infarctée (ZI) ainsi que la qualité de la récupération fonctionnelle post-ischémique à court et long terme. La mort des cardiomyocytes résulte de 3 processus différents que sont la nécrose, l'apoptose et l'autophagie (Chiong *et al.*, 2011 ; pour revue).

a. La nécrose

La nécrose cellulaire au cours de l'IR résulte principalement de la déplétion en ATP survenant lors de l'ischémie, responsable d'une incapacité de la cellule à maintenir son activité vitale. Notamment, l'inactivation des canaux ioniques ATP-dépendants est responsable d'une altération de l'homéostasie ionique cellulaire, à l'origine d'un gonflement cellulaire et d'altérations membranaires menant à la rupture létale de la cellule. De plus, la

surcharge calcique ischémique peut induire une activation des calpaines également impliquées dans les altérations de l'intégrité membranaire. Lors de la reperfusion, les altérations mitochondriales responsables d'une limitation de la synthèse d'ATP et d'une production accrue de RLO vont prolonger ce processus nécrotique (Murphy & Steenbergen, 2008 ; pour revue).

b. L'apoptose

L'apoptose, introduite par Kerr *et al.* en 1972 (Kerr *et al.*, 1972), est définie comme le processus de mort cellulaire physiologiquement « programmée ». Elle est régulée par la balance entre signaux de survie (facteurs anti-apoptotiques) et de mort cellulaire (facteurs pro-apoptotiques). Elle consiste en une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire. Le processus apoptotique semble être initié par les conditions ischémiques et est ensuite amplifié au cours de la reperfusion, principalement suite à la surcharge calcique et la production de RLO (Fliss & Gattinger, 1996 ; Gottlieb, 2011). Le signal de mort cellulaire au cours de l'apoptose est essentiellement transmis par l'activation de caspases, des protéases à cystéine, responsables du clivage de l'ADN et de composants protéiques essentiels à la survie cellulaire (Wolf & Green, 1999). De nombreux travaux ont montré le rôle clef de la mitochondrie dans le processus apoptotique. En effet l'ouverture du mPTP provoque la libération par la mitochondrie de facteurs pro-apoptotiques dont les plus reconnus sont le cytochrome c et l'AIF, ainsi que le Smac/DIABLO (Van Empell *et al.*, 2005 ; Gottlieb, 2011 ; pour revues). Ces derniers sont pour la plupart dépendants de la voie des caspases (Crow *et al.*, 2004). Par ailleurs, un processus non mitochondrial mais lié aux récepteurs membranaires, impliquant principalement le récepteur Fas, a également été rapporté comme

impliqué dans l'activation de l'apoptose par les caspases au cours de l'IR (Jeremias *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2003).

c. L'autophagie

L'autophagie est un processus physiologique permettant l'expulsion et la dégradation des organites ou macromolécules cellulaires endommagés afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. De nombreuses études ont rapporté une augmentation de ce processus au cours de l'IR, néanmoins son rôle fait l'objet de controverses (Przyklenk *et al.*, 2012, pour revue). En effet, alors que certaines études attribuent à l'autophagie un rôle dans la mort cellulaire survenant au cours de l'IR (Valentim *et al.*, 2006 ; Matsui *et al.*, 2007), d'autres lui attribuent un rôle d'adaptation bénéfique contribuant à la survie du myocarde ischémié (Yan *et al.*, 2005 ; Hamacher-Brady *et al.*, 2006). Bien qu'aucun consensus ne soit actuellement établi, il semblerait que l'autophagie soit un processus bénéfique au maintien de l'homéostasie cellulaire en cas de réponse à un stress ischémiqum modéré, mais puisse devenir délétère en cas de stimulation excessive induite par une ischémie prolongée et une production exacerbée de RLO au cours de la reperfusion (Takagi *et al.*, 2007 ; Gustafsson & Gottlieb, 2009 ; pour revues).

1.3. Sources de stress oxydant dans le cœur

La régulation du statut redox cellulaire résulte d'un équilibre entre facteurs pro-oxydants et facteurs antioxydants. On parle de stress oxydant lorsque survient un déséquilibre en faveur des facteurs pro-oxydants. Ainsi, Halliwell (Halliwell B, 1999) définit le stress oxydant comme « l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre les agressions des espèces oxygénées réactives, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ses substances et la capacité de défense des antioxydants ». Au cours d'un stress oxydant, des

dégradations oxydatives vont avoir lieu aux niveaux des macromolécules biologiques tels que les acides nucléiques, les protéines et les lipides. Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces nombreuses altérations oxydatives sont massivement impliquées dans les lésions de reperfusion.

1.3.1. Facteurs pro-oxydants : les radicaux libres dérivés de l'oxygène

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche de valence, ce qui lui confère une très forte réactivité avec les molécules environnantes. Dans le cas du stress oxydant, ces radicaux libres sont tous dérivés de l'O₂, et portent ainsi le nom de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). En condition physiologique, ces RLO sont produits en très faibles quantités par le métabolisme oxydatif normal de la cellule, avec notamment 2% de l'O₂ consommé par la chaîne respiratoire mitochondriale transformé en RLO (Cadenas & Davies, 2000). Mais lors de phénomènes de stress oxydant, ils peuvent être générés à de très fortes concentrations. Ainsi parmi les RLO, on trouve tout d'abord l'anion superoxyde (O₂^{•-}), qui peut ensuite être à l'origine de réactions en chaîne entraînant la formation du radical hydroxyle (•OH), du radical perhydroxyle (HO₂[•]), du radical peroxyde (RO₂[•]) et du radical alkoxyle (RO[•]). La dismutation d'O₂^{•-} par la superoxyde dismutase (SOD) peut aussi conduire à la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui n'est pas une forme radicalaire mais qui possède tout de même une forte toxicité *via* ses réactions possibles avec les espèces ioniques, notamment les métaux de transition. La toxicité de l'O₂^{•-} résulte i) de ses interactions directes avec les différents constituants cellulaires, ii) de ses réactions chimiques à l'origine des RLO énoncés précédemment, et enfin iii) de sa réaction avec le NO pour former des espèces réactives oxygénées azotées dont le peroxynitrite (ONOO⁻), à l'origine d'un stress nitro-oxydant. Le ONOO⁻ est le radical le plus réactif et induit une cytotoxicité importante du fait de ses nombreuses cibles et actions cellulaires. En effet ce dernier peut i) provoquer l'oxydation et/ou la nitration des acides aminés et protéines,

menant ainsi à leur inactivation ou à une altération de leur fonctionnement, ii) induire une peroxydation lipidique, à l'origine d'une perméabilité des membranes, et iii) altérer l'ADN et ainsi endommager la synthèse protéique et/ou activer l'induction de voies pro-apoptotiques (Pacher *et al.*, 2007 ; pour revue). L'ensemble de ces effets hautement délétères font de la production de ONOO⁻ un élément clef de la gravité des lésions de reperfusion myocardique.

1.3.2. Sources de radicaux libres au cours de l'ischémie-reperfusion

En condition physiologique, les RLO sont produits en très faibles quantités et jouent un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire et la régulation du métabolisme cellulaire (Droge, 2002 ; Ray *et al.*, 2012). Néanmoins en condition pathologique, lorsqu'ils sont produits à de fortes concentrations, ils deviennent hautement toxiques. Ainsi, dans le cadre de l'IR, leur production massive au moment de la reperfusion est reconnue comme hautement délétère (Garlick *et al.*, 1987 ; Zweier & Talukder, 2006). Parmi les différentes sources potentielles de RLO au cours de l'IR, les plus étudiées sont la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase, la voie de la xanthine oxydase et les NOS.

a. La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est la première source d'O₂⁻ au cours de l'IR. Durant l'ischémie, où le métabolisme aérobie est ralenti ou totalement arrêté, les coenzymes réduits (NADH-H⁺ et FADH₂) s'accumulent puisqu'ils ne peuvent être recyclés par l'activité métabolique mitochondriale. Mais au moment de la reperfusion, leur renouvellement engendre une grande libération d'électrons qui ne pourront pas tous être pris en charge par la chaîne respiratoire ; certains sont alors transférés à l'O₂ pour produire de l'O₂⁻. Cette fuite anormale d'électrons a essentiellement lieu au niveau des complexes I et III de la mitochondrie (Liu *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2003 ; Turrens, 2003). De plus, l'altération des composés de la chaîne

respiratoire par l'acidose ischémique et par les RLO lors de la reperfusion renforce le dysfonctionnement mitochondrial, exacerbant ainsi la production de RLO par l'organite.

b. La NADPH oxydase

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'O₂ en O₂⁻ en utilisant comme substrat le NAD(P)H. Bien que découverte et beaucoup plus étudiée au niveau phagocytaire, elle est présente de manière constitutive dans toutes les cellules. Activée lors d'un stress inflammatoire et/ou oxydant, la NADPH oxydase phagocytaire joue un rôle majeur dans la production de RLO au cours des pathologies cardiovasculaires (Griendling *et al.*, 2000; Brandes *et al.*, 2010 ; pour revues). Au niveau cardiaque, la NAD(P)H oxydase des cellules endothéliales, mais également des cardiomyocytes, a été massivement rapportée comme une source majeure de RLO lors de l'IR, contribuant ainsi à la sévérité des lésions de reperfusion (Octavia *et al.*, 2012 ; pour revue).

c. La voie de la xanthine oxydase (XO)

La XO est une enzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine dans le métabolisme des purines en utilisant de l'O₂, ce qui génère de l'O₂⁻. Au cours de l'IR, la surcharge calcique et la réduction de synthèse d'ATP provoquent une activation la XO (Chambers *et al.*, 1985 ; Mc Cord *et al.*, 1995).

d. Les nitrique oxyde synthétases (NOS)

Les NOS sont des métalloenzymes qui, sous forme d'homodimère, permettent la synthèse de NO. En condition pathologique, elles peuvent être présentes sous forme de monomère et produisent alors de l'O₂⁻.

La formation de RLO par les NOS et leur rôle dans l'IR seront abordés en détails dans la section suivante.

1.3.3. Facteurs antioxydants

L'organisme possède un système de défenses contre la production des RLO regroupé sous le terme de « facteurs antioxydants ». On distingue un système antioxydant enzymatique, le plus puissant, et un système antioxydant non-enzymatique.

Les principaux composants du système antioxydant non-enzymatique présents dans l'organisme sont le glutathion, la bilirubine, les œstrogènes, l'acide urique, le coenzyme Q, la mélanine et l'acide lipoïque. De plus, il existe des antioxydants non-enzymatiques exogènes tels que les vitamines (notamment E, A et C), les caroténoïdes, les polyphénols, ainsi que le zinc et le sélénium dont le rôle antioxydant est indirect en assurant la stabilisation et le maintien des défenses antioxydantes. Bien que les bienfaits thérapeutiques de ce système antioxydant non-enzymatique aient été rapportés dans divers études (Curin & Andriantsitohaina, 2005 ; Gaby, 2010 ; pour revue), celui-ci reste bien moins efficace que le système antioxydant enzymatique.

Le système antioxydant enzymatique est constitué de l'interaction de 3 enzymes principales : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) (Fig. 1.3).

a. *La superoxyde dysmutase (SOD) :*

C'est une métalloenzyme qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et O_2 . Son intervention en première ligne dans l'élimination des RLO lui confère un rôle décisif dans le contrôle du statut redox cellulaire et dans la survie en milieu aérobie. On distingue 3 isoformes de SOD qui se différencient en fonction du métal les constituant et de leur localisation cellulaire : la SOD cuivre-zinc (CuZnSOD ou SOD1) présente au niveau du cytoplasme et de l'espace mitochondrial inter-membranaire ; la SOD manganèse (MnSOD ou SOD2) localisée au niveau de la matrice et de la membrane interne mitochondriales ; et la CuZnSOD extracytosolique (ou SOD3) que l'on retrouve surtout au niveau de la matrice extracellulaire. L'activité de la SOD donnant lieu à la formation d' H_2O_2 , son action antioxydante n'est complète que si d'autres enzymes, la GPx et la CAT, permettent l'élimination de cette molécule.

b. *La glutathion peroxydase (GPx) :*

La GPx permet d'éliminer l' H_2O_2 en couplant sa réduction avec l'oxydation d'un substrat réducteur, le glutathion. Ainsi l' H_2O_2 est catalysé en H_2O tandis que le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSG). Il est à noter que la GPx peut également catalyser d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique et qu'il en existe 5 isoformes de localisations tissulaires différentes. La plus abondante est l'isoforme 1 (GPx1) présente au niveau cytoplasmique et mitochondriale, et exprimée dans la plupart des cellules.

c. *La catalase (CAT)*

La CAT est une enzyme héminique responsable de la catalyse du H_2O_2 en H_2O et O_2 par une réaction de dismutation. Il est à noter que la constante de Michaelis-Menten (K_m) de la CAT pour l' H_2O_2 est supérieure à celle de la GPx, lui conférant un rôle prépondérant lorsque

la concentration en H_2O_2 est supérieure au K_m de la GPx. Néanmoins les différentes localisations subcellulaires de la CAT et de la GPx leurs confèrent un rôle complémentaire.

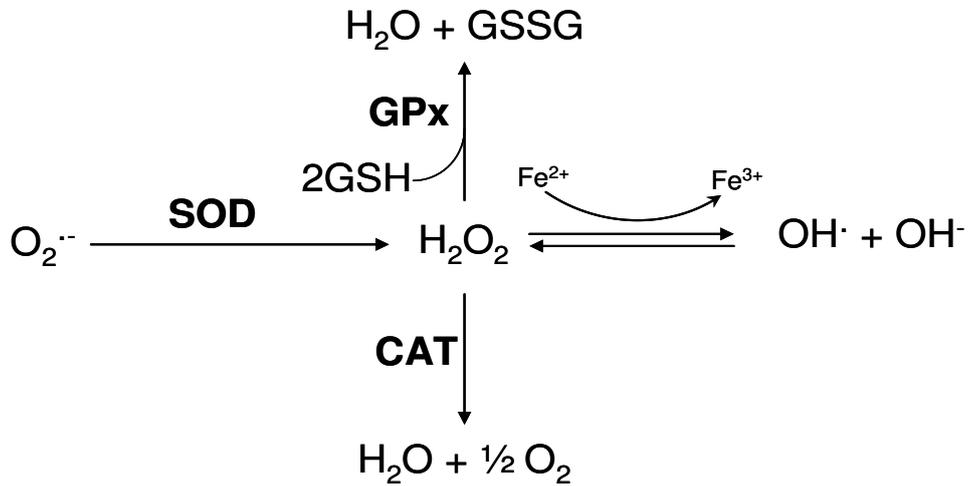


Figure I.3 : Système antioxydant enzymatique. SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; CAT : catalase.

2. Rôle du NO et de la eNOS dans l'ischémie-reperfusion myocardique

2.1. Généralités sur le NO et les NOS

Le NO est un composé chimique constitué d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote, rencontré sous forme gazeuse en condition normale de pression et de température. Ce gaz lipophile, de charge neutre, possède une très grande capacité de diffusion à travers les tissus et en milieu biologique sa demi-vie est inférieure à 1 seconde (Pacher *et al.*, 2007). Etant lui-même un composé radicalaire, le NO présente une très grande réactivité avec les espèces radicalaires, notamment l'oxygène et l'O₂⁻, ainsi qu'avec les métaux et les groupements thiols, ce qui lui confère un rôle fonctionnel cellulaire essentiel. Il a été identifié pour la première fois dans le système cardiovasculaire en 1980 par Furchgott & Zawadzki (Furchgott & Zawadzki, 1980) qui démontrèrent *in vitro* la présence d'un facteur libéré par l'endothélium vasculaire responsable d'une vasorelaxation, alors nommé « *Endothelium-Derived Relaxing Factor* ». C'est en 1987 que ce puissant vasorelaxant fut identifié sous le terme de NO (Ignarro *et al.*, 1987 ; Palmer *et al.*, 1987). Depuis, le NO a fait l'objet d'une multitude de travaux et est aujourd'hui reconnu comme un régulateur clef de l'homéostasie cardiovasculaire, tant en conditions physiologiques que pathologiques (Hare, 2003 ; Massion *et al.*, 2003 ; Pacher *et al.*, 2007 ; Seddon, 2007 ; Otani, 2009). Dans cette revue de littérature nous porterons une attention plus particulière au rôle du NO sur la régulation de la fonction myocardique.

Le NO est essentiellement synthétisé par des NO-synthétases, les NOS (*Nitric Oxide Synthases*). Les NOS sont présentes dans l'organisme sous 3 isoformes majeures : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1, codée par le gène *NOS1*, protéine de 150 kDa), la NOS inductible (iNOS ou NOS2, codée par le gène *NOS2*, protéine de 130 kDa) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3, codée par le gène *NOS3*, protéine de 133 kDa). Une 4^{ème}

isoforme mitochondriale (mtNOS) est également rapportée dans la littérature mais reste à ce jour encore peu étudiée (Zaobornyj & Ghafourifar, 2012). Ces 3 principales isoformes diffèrent par : i) leurs localisations, tant au niveau organique que cellulaire, bien qu'elles soient toutes exprimées dans le système cardiovasculaire, ii) leur caractère constitutif ou inductible, et iii) la régulation post-transcriptionnelle de leurs activités. En effet, les isoformes neuronale et endothéliale (1 et 3), nommées en fonction de leur chronologie de découverte et du tissu dans lequel elles ont été identifiées, sont exprimées de manière constitutive et leur activité est Ca^{2+} /calmoduline (CaM) dépendante. La nNOS est exprimée dans le tissu nerveux, mais également aux niveaux du muscle lisse vasculaire et des cardiomyocytes. La eNOS est exprimée aux niveaux des cellules endothéliales vasculaires et endocardiques, ainsi qu'au niveau neuronal, des plaquettes sanguines, de certaines cellules épithéliales, et dans les cardiomyocytes. Au niveau cellulaire, la nNOS est co-localisée avec le RS tandis que la eNOS est confinée au sein des cavéoles. Cette différence de situation cellulaire est rapportée comme responsable des spécificités fonctionnelles du NO selon l'isoforme dont il provient (Barouch *et al.*, 2002). Ces isoformes constitutives sont hautement régulées, tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel (Searles, 2006 ; Mount *et al.*, 2007 ; Balligand *et al.*, 2009 ; Fleming, 2010). La iNOS est une isoforme inductible exprimée en condition pathologique, en réponse à un stress inflammatoire ou oxydatif. Son activité est indépendante du Ca^{2+} , et contrairement aux isoformes constitutives son activité est essentiellement déterminée par son niveau d'expression (Umar & van der Laarse, 2010 ; pour revue). Alors que les NOS constitutives induisent une synthèse de NO à des concentrations cellulaires de l'ordre du nanomolaire, la iNOS génère une production de NO 10 à 100 fois supérieure, avec des concentrations cellulaires pouvant atteindre le micromolaire.

Le NO peut également être synthétisé de manière non enzymatique à partir du nitrite (NO_2^-) en condition d'acidose et de faible pression en O_2 (Zweier *et al.*, 1999). Les S-nitrosothiols, issus de la fixation du NO sur un groupe thiol d'un résidu cystéine, constituent

une autre source de stockage endogène de NO pouvant jouer un rôle important dans la synthèse non-enzymatique de NO (Maron *et al.*, 2012 ; pour revue).

Au niveau vasculaire, le rôle fondamental du NO dans la régulation de la vasomotricité par son action vasodilatatrice est largement reconnu (Moncada *et al.*, 1991). Au niveau myocardique, le rôle du NO est plus complexe et controversé du fait de ses nombreuses cibles cellulaires, de l'influence de sa concentration et de sa source de production, de ses modes d'action par voie directe (S-nitrosylation) ou en tant qu'activateur de la voie de signalisation GCs-GMPc-PKG-dépendante. Néanmoins un consensus semble se dégager sur le rôle bimodal du NO sur la contractilité du myocarde : de faibles concentrations de NO ($< 1\mu\text{M}$) ont un effet inotrope positif, tandis que de fortes concentrations ($> 10\mu\text{M}$) induisent un effet inotrope négatif (Kodja & Kottenberg, 1999 ; Massion *et al.*, 2003). D'autre part, les concentrations très importantes de NO générées par la iNOS ont été rapportées comme pouvant être délétères et impliquées dans le développement de certaines cardiomyopathies (Wildhirt *et al.*, 1997 ; Han *et al.*, 2003). Enfin, la réaction extrêmement rapide du NO avec l' O_2^- pour former du ONOO^- peut expliquer le rôle potentiellement délétère du NO dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Pacher *et al.*, 2007).

2.2. Synthèse du NO par la eNOS et régulation de la eNOS

2.2.1. Synthèse du NO par la eNOS

La eNOS est une enzyme active sous forme d'homodimère contenant un hème ferrique, et dont chaque monomère contient un domaine réductase et un domaine oxygénase. Elle est responsable de la conversion de la L-arginine et de l' O_2 en NO, L-citrulline et H_2O , *via* un transfert d'électron dérivé du NADPH et passant du domaine réductase d'un monomère au domaine oxygénase du monomère homologue. Sur chaque monomère l'extrémité COOH-

terminale réductase contient les sites de fixation du FAD (*Flavine Adenine Dinucleotide*), du FMN (*Flavine Mononucleotide*) et du NADPH, tandis que l'extrémité NH₂-terminale oxygénase possède les sites de fixation de l'hème ferrique, du BH₄ et de la L-arginine. Ces deux domaines sont reliés par un complexe Ca²⁺/CaM permettant le transfert d'électron d'un monomère à l'autre, et conférant à la eNOS son activité Ca²⁺/CaM dépendante. La catalyse du NO est ainsi induite par le transfert d'un électron issu de la NADPH au FAD puis au FMN, qui va permettre la conversion de l'hème ferrique (Fe³⁺) en son état ferreux (Fe²⁺) permettant ainsi la fixation de l'O₂ sur la eNOS et autorisant la synthèse de NO par oxydation de la L-arginine. La stabilité du dimère et son activité catalytique sont assurées par l'hème ainsi que par la présence du BH₄ associé à un complexe zinc-tétrathiolate (ZnS₄ « *zinc cluster* »). En effet, en plus de l'électron délivré par le NADPH, le BH₄ fournit également temporairement un électron à l'hème ferreux afin de maintenir la fixation de l'O₂ sur ce dernier (Zweier *et al.*, 2011 ; pour revue). Le radical BH₃[·] temporairement formé est ensuite réduit par le domaine réductase de la NOS pour régénérer du BH₄ et permettre le maintien du cycle catalytique. En cas d'absence de BH₄, la liaison entre l'O₂ et l'hème ferreux est rompue et la NOS produit alors de l'O₂^{·-}. Par conséquent, le BH₄ est rapporté dans la littérature comme étant le cofacteur essentiel au maintien de l'état fonctionnel, dit « couplé », de la eNOS (Fig. I.4).

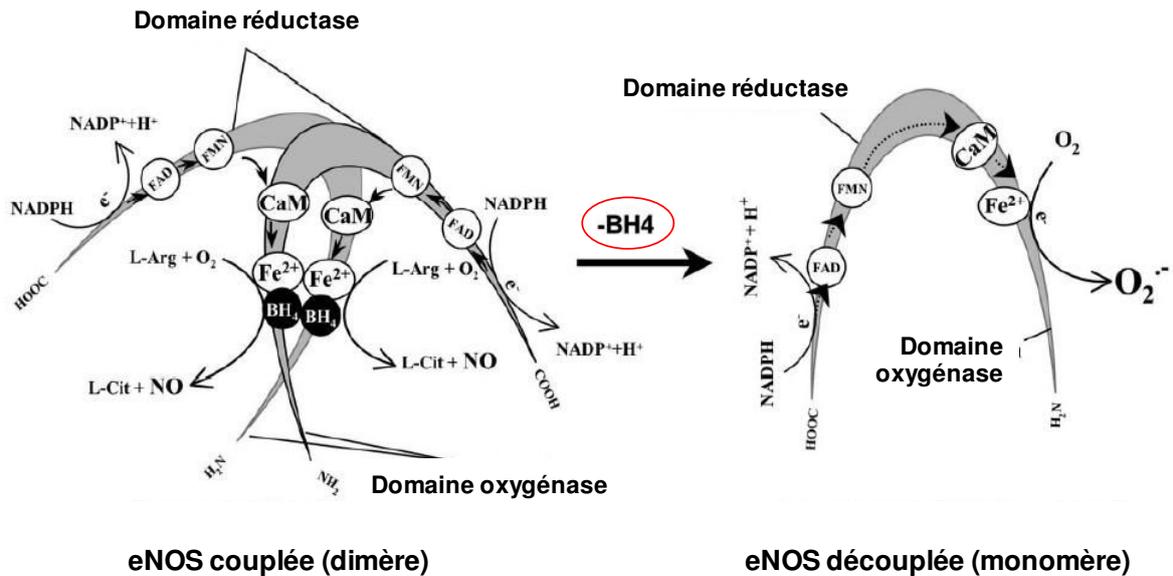


Figure I.4 : Synthèse du NO par la eNOS et découplage de la eNOS par déplétion en BH₄. Adapté de Lu *et al.* 2009.

Le BH₄ fait partie de la famille des ptérines et a été identifié comme cofacteur essentiel de la eNOS en 1989 par l'équipe de Stuehr (Kwon *et al.*, 1989) ainsi que Tayeh et Marletta (Tayeh & Marletta, 1989). Il est synthétisé dans le cytoplasme par 2 voies métaboliques que sont le « *de novo pathway* » et le « *salvage pathway* ». Dans cette première voie le BH₄ est synthétisé à partir de GTP (Guanylate triphosphate) par une succession de réactions chimiques initiées par la GTP cyclohydrolase-1 (GTPCH ou GCH-1). Cette dernière apparaît être l'enzyme limitante de la synthèse *in vivo* de BH₄. Une voie alternative, le « *salvage pathway* », induit la synthèse de BH₄ par la production intermédiaire de sépiaptérine. Celle-ci est métabolisée en BH₂ (dihydrobioptérine), puis réduite en BH₄ par la DHFR (Dihydrofolate reductase) (Thony *et al.*, 2000 ; Schmidt & Alp, 2007 ; pour revues) (Fig.I.5).

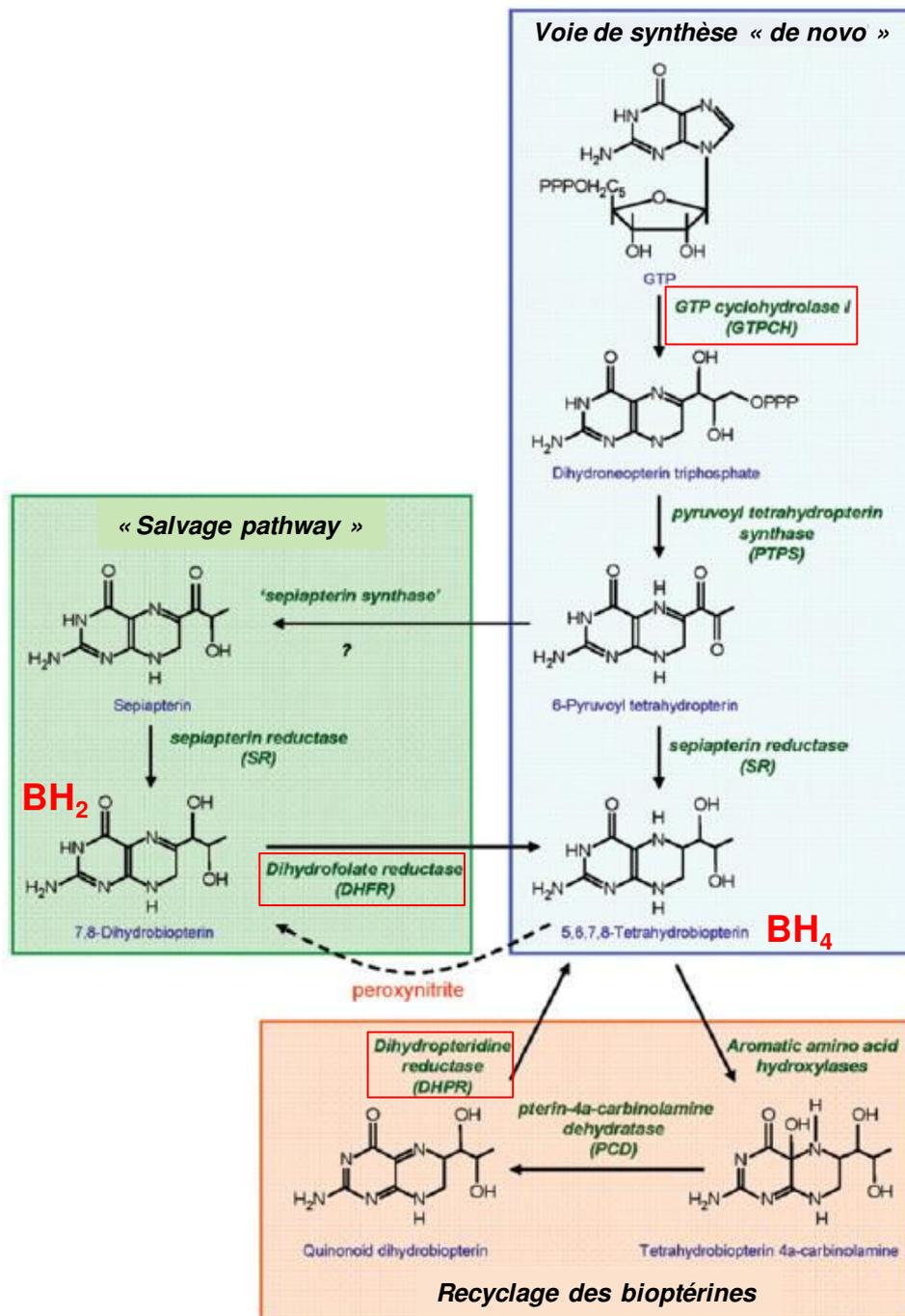


Figure I.5 : Voies de biosynthèse et de recyclage du BH₄. Adapté de Schmidt & Alp, 2007.

2.2.2. Découplage de la eNOS

La déplétion en BH₄, liée à une diminution de sa biodisponibilité ou à son oxydation en BH₂, est à l'origine d'une monomérisation de la eNOS, alors dite « découplée » (Fig. I.4). En

cas de découplage, la synthèse de NO est abrogée et la eNOS produit alors de l'O₂⁻ (Xia, 2007 ; pour revue). De plus lorsqu'une production co-localisée de NO et d'O₂⁻ a lieu, ils se combinent spontanément pour former du ONOO⁻. La vitesse de cette réaction chimique est uniquement limitée par la vitesse de diffusion des réactifs, puisque le NO est le composé réagissant le plus rapidement avec l'O₂⁻, au point de rendre la dismutation de l'O₂⁻ par la SOD quasiment inutile dans le cas d'une production co-localisée (Pacher *et al.*, 2007). De plus, le ONOO⁻ a été rapporté dans la littérature comme pouvant être à l'origine d'un découplage de la eNOS par oxydation du BH₄ (Kuzkaya *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2010) ou du complexe ZnS₄ (Zou *et al.*, 2002). L'oxydation du BH₄ a pour conséquence de limiter sa disponibilité d'une part, et de diminuer le ratio BH₄/BH₂ d'autre part. Or ce dernier apparaît être le facteur essentiel dans la régulation du maintien de l'état fonctionnel de la eNOS (Vasquez-Vivar *et al.*, 2002 ; Bendall *et al.*, 2005 ; Crabtree *et al.*, 2009). Sugiyama *et al.* (2009) ainsi que Crabtree *et al.* (2009) ont effectivement mis en évidence qu'une inhibition de la DHFR est responsable d'un découplage de la eNOS par diminution du ratio BH₄/BH₂, tandis que l'inhibition de la GTPCH, responsable d'une importante réduction du contenu total en biptérines, sans changement du ratio BH₄/BH₂, n'a que très peu de conséquence sur la production d'O₂⁻ par la NOS. Ainsi, l'altération de la eNOS par le ONOO⁻ contribue à la mise en place d'un cercle vicieux de découplage de la eNOS et d'aggravation du stress nitro-oxydant cellulaire. Ce processus délétère apparaît massivement impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Pacher *et al.*, 2007 ; Otani, 2009 ; pour revues). Par ailleurs, l'équipe de Zweier a récemment mis en évidence qu'en situation de stress oxydant, une S-glutathionylation post-transcriptionnelle de la eNOS était responsable d'un découplage réversible de l'enzyme (Chen *et al.*, 2010; Zweier *et al.*, 2011).

2.2.3. Régulation de l'activité de la eNOS

La eNOS est une enzyme hautement régulée à l'échelle transcriptionnelle mais également très spécifiquement à l'échelle post-transcriptionnelle.

a. *Régulation transcriptionnelle*

La régulation de l'expression de la eNOS est largement rapportée dans la littérature comme étant principalement induite en réponse à une contrainte de cisaillement, ou « *shear stress* » vasculaire et « *stretching* » cardiomyocytaire. Ce mécanisme a été brillamment révisé par Balligand *et al.* (2009) qui exposent les rôles essentiels du NFkB (*nuclear factor-kappa B*) et de KLF2 (*Kruppel like factor 2*) dans l'induction transcriptionnelle de la eNOS. De plus, une production modérée de RLO, telle que retrouvée lors d'un exercice physique chronique, semble pouvoir également favoriser l'augmentation d'expression de eNOS (Lauer *et al.*, 2005). La transduction du signal mécanique en signal de transcription cellulaire semble essentiellement passer par l'activation d'intégrines, protéines transmembranaires liées notamment aux cavéoles.

b. *Régulation post-transcriptionnelle*

Au niveau post-transcriptionnel, l'activité de la eNOS est finement régulée par de multiples mécanismes: des lipidations, des interactions protéiques impliquant principalement le complexe Ca^{2+}/CaM associé aux cavéolines et la Hsp90 (*Heat Shock Protein* de 90 kDa), de nombreuses phosphorylations, la glycosylation et glutathionylation, la disponibilité en substrat et cofacteur (respectivement L-arginine et BH_4), et par un inhibiteur endogène de NOS.

➤ *Lipidation :*

La eNOS est la seule isoforme de NOS qui contient un groupe myristoylé sur son extrémité N-terminale. Celui-ci permet l'attachement de l'enzyme à la membrane cellulaire et le couplage adéquate de ses activateurs. De plus une palmitoylation réversible de l'enzyme la dirige spécifiquement vers les membranes des cavéoles (Sessa *et al.*, 1993 ; Liu *et al.*, 1996).

➤ *Interactions protéiques :*

En se fixant sur la CaM présente sur la eNOS, le Ca^{2+} provoque le déplacement de la liaison inhibitrice entre la eNOS et la cavéoline, rendant ainsi la eNOS fonctionnelle. Par conséquent, la formation du complexe Ca^{2+} /CaM est essentielle à l'activation de la eNOS dite « Ca^{2+} dépendante ». Les cavéolines sont des protéines membranaires associées aux cavéoles, au niveau desquelles la eNOS est séquestrée. L'interaction directe entre les cavéolines (isoformes 1 et 3, respectivement endothéliale et cardiomyocytaire) et la eNOS maintient cette dernière dans un état inactif (Michel *et al.*, 1997 ; Feron & Balligand, 2006). Au-delà d'une simple inhibition de type « on/off », la cavéoline semble réguler l'activité de la NOS de manière fine et spécifique. Karuppiyah *et al.* (2011) ont ainsi mis en évidence, au niveau vasculaire, le rôle critique de la cavéoline-1 dans la régulation de la production d' O_2^- par la eNOS lorsque celle-ci est découplée, *via* un mécanisme bioprotéine-dépendant. Dans cette étude les auteurs montrent qu'en situation de déplétion cellulaire en BH_4 , le lien entre la cavéoline-1 et la eNOS est augmenté, induisant ainsi une augmentation de la séquestration de la eNOS dans les cavéoles afin de limiter la synthèse de O_2^- par la eNOS découplée (« *biopterin-free eNOS* »). Ce mécanisme de régulation par la cavéoline n'est toutefois pas observé lorsque la eNOS est découplée par une diminution du rapport BH_4/BH_2 (*BH₂-eNOS*). De plus, la Hsp90, une protéine chaperon du cytosol, favorise l'association de la CaM à la eNOS et donc l'activation de l'enzyme, mais participe également à la régulation de l'activité

de l'enzyme par diverses phosphorylations, dont notamment par le recrutement d'Akt. L'association de la Hsp90 à la eNOS est favorisée par la stimulation de facteurs endothéliaux (VEGF, insuline, statine, histamine) et par les contraintes de cisaillements (Garcia-Cardena *et al.*, 1998 ; Balligand *et al.*, 2009) (Fig. I.6).

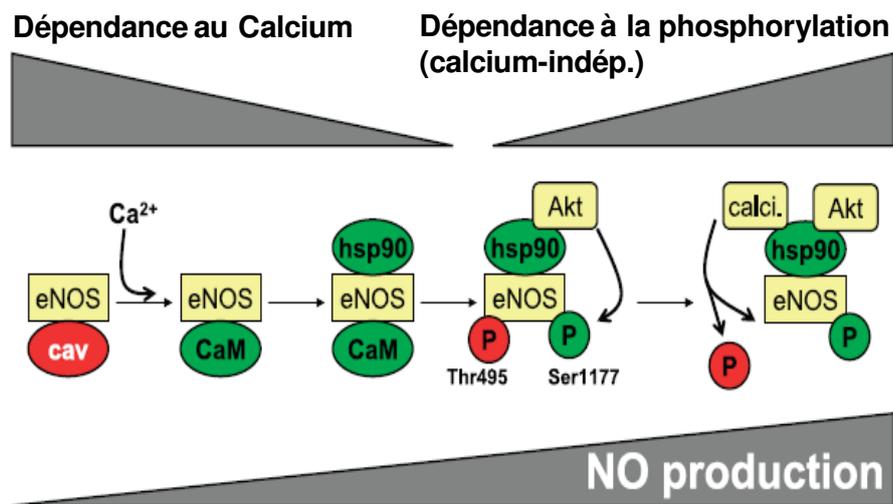


Figure I.6 : Régulation post-transcriptionnelle de la eNOS par interaction protéique et phosphorylation. Cav : cavéoline ; CaM : calmoduline ; hsp90 : *heat shock protein* (90 kDa). Adapté de Balligand *et al.*, 2009.

➤ *Phosphorylation* :

La régulation de la NOS par phosphorylation de différents résidus de la protéine est un mécanisme majeur du contrôle de son activité. La eNOS peut être phosphorylée sur des résidus sérine (Ser), thréonine (Thr) et tyrosine (Tyr) (Fleming, 2010 ; pour revue). Il existe de multiples sites de phosphorylation sur la eNOS, mais les plus étudiés et reconnus dans la littérature sont l'activation de l'enzyme par phosphorylation du résidu Ser¹¹⁷⁷ et son inhibition par la phosphorylation du résidu Thr⁴⁹⁵. Le résidu Ser¹¹⁷⁷ est phosphorylé par différentes kinases, en particulier Akt (ou PKB), mais aussi par la PKA, la PKG, l'AMPK et la CaMKII. La

phosphorylation de l'enzyme sur son résidu Ser¹¹⁷⁷ a pour conséquence la translocation de l'extrémité COOH-terminale réductase, favorisant ainsi la fixation du FMN sur le monomère et donc le transfert d'électron. Cette phosphorylation est stimulée par divers mécanismes dont principalement le stress de cisaillement ou d'étirement (PKA et Akt dépendant), l'hypoxie, la stimulation β_3 -adrénergique (β_3 -AR) et divers agonistes (VEGF, insuline, oestrogènes, bradykinine). D'autres résidus sérines peuvent être impliqués dans l'activation de la eNOS par phosphorylation, telles que les Ser⁶¹⁷ et Ser⁶³⁵.

La maintien de l'état phosphorylé du résidu Thr⁴⁹⁵ induit une inhibition de la eNOS par limitation de la fixation de la CaM sur l'enzyme, et semble être régulé par l'activité d'une PKC. La régulation de l'activité de la eNOS par phosphorylation de la Thr⁴⁹⁵ semble être expliquée par une levée de l'inhibition liée à cette phosphorylation (alors activatrice) et non réellement par son effet inhibiteur (Harris *et al.*, 2001 ; Greif *et al.*, 2002). Enfin, la découverte de sites de phosphorylation de la eNOS sur des résidus Tyr (Tyr⁸¹ et Tyr⁶⁵⁷) est récente et leurs effets sur la régulation de l'activité de la eNOS sont encore incertains (Fleming, 2010). Il semblerait que la phosphorylation de la Tyr⁸¹ soit activatrice (Fulton *et al.*, 2005), tandis que la phosphorylation de la Tyr⁶⁵⁷ semble inhibitrice (Fisslthaler *et al.*, 2008), mais ces résultats restent à confirmer (Fig. 1.7).

Par ailleurs, Chen *et al.* (2008) évoquent dans leur travail que tout mécanisme de phosphorylation responsable d'une augmentation de la synthèse de NO par la eNOS couplée peut exacerber la production d'O₂⁻ lorsque celle-ci est découplée. Aussi, Lin *et al.* (2003) ont démontré dans leur étude que la modulation de la phosphorylation de la Thr⁴⁹⁵ semble faciliter le passage (« *switch* ») d'une eNOS productrice de NO vers une eNOS productrice d'O₂⁻.

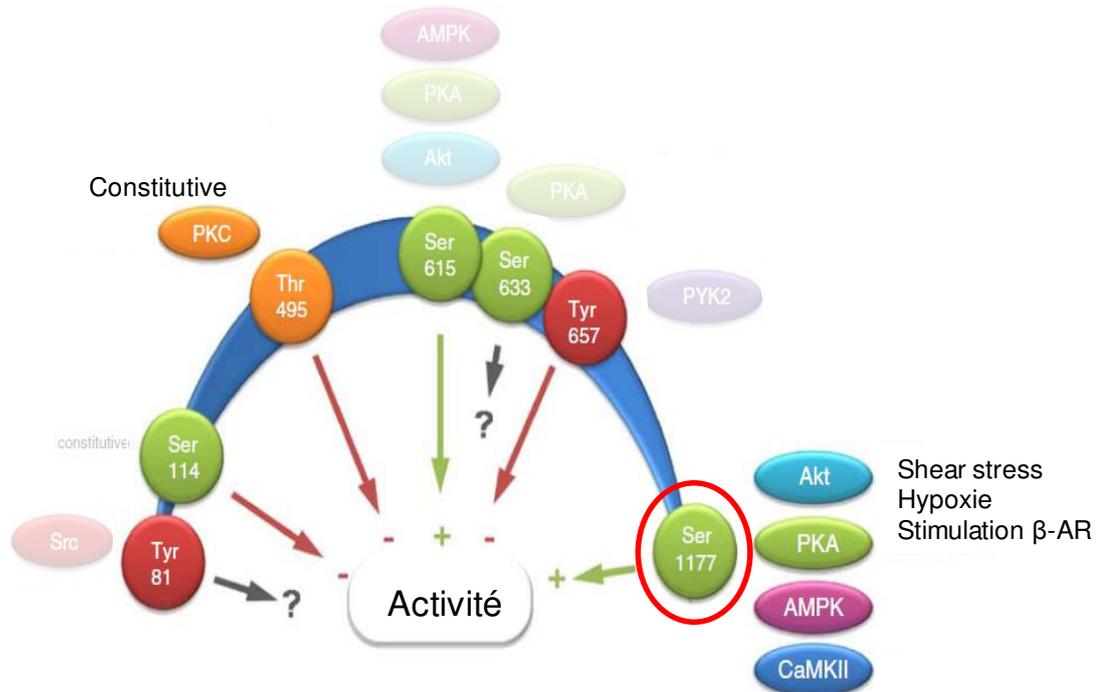


Figure I.7 : Régulation post-transcriptionnelle de la eNOS par phosphorylation. Adapté de Fleming, 2010.

➤ *Autres modes de régulation fonctionnelle : glycosylation et S-glutathionylation*

La glycosylation peut affecter le fonctionnement de protéines cytosoliques et nucléaires *via* son action au niveau de résidus Ser et Thr (Whelan & Hart, 2003). L'hyperglycémie peut ainsi induire une inhibition de la eNOS par une glycosylation proche du site enzymatique de phosphorylation d'Akt (Du *et al.*, 2001). D'autre part, récemment, dans une étude vasculaire, l'équipe de Zweier a démontré qu'en situation de stress oxydatif, modifiant le ratio GSH-GSSG, une S-glutathionylation de la eNOS était à l'origine d'un découplage réversible de la eNOS (Chen *et al.*, 2010).

➤ *Disponibilités en substrat et cofacteur :*

La disponibilité du substrat, la L-arginine, influence directement l'activité catalytique de la eNOS. En condition physiologique, la L-arginine n'est pas un facteur limitant dans la production de NO. Néanmoins, dans certaines conditions pathologiques, la disponibilité en L-arginine peut être réduite, induisant une réduction de la production enzymatique de NO et une augmentation de la synthèse d'O₂⁻ (Moncada *et al.*, 1991). Comme exposé précédemment, la disponibilité en BH₄ est également un élément clef du bon fonctionnement de la NOS puisque sa déplétion ou son oxydation sont responsables d'un découplage de l'enzyme.

➤ *Inhibiteur endogène de NOS :*

L'activité de la eNOS peut être diminuée par l'ADMA (diméthyl-arginine asymétrique), un inhibiteur endogène de l'enzyme synthétisé par la DDAH (dimethylarginine dimethylaminohydrolase). La concentration d'ADMA peut être augmentée dans certaines pathologies telles que l'athérosclérose, induisant alors une dysfonction endothéliale (Achan *et al.*, 2003). A ce jour, les effets de l'ADMA ont essentiellement été étudiés au niveau vasculaire et ne reste que très peu documentés au niveau du tissu cardiaque.

2.3. NO et fonctions cardiovasculaires

Depuis sa découverte en tant que facteur vasorelaxant dérivé de l'endothélium, le rôle du NO sur la fonction vasculaire a été largement décrit. Par la suite, le NO a été impliqué dans la régulation du fonctionnement de nombreux organes dont le myocarde. Après plus de deux décennies de recherches, le NO est aujourd'hui reconnu comme un élément clef de la régulation de la fonction myocardique. Dans le cadre de cette revue de la littérature, et en accord avec les objectifs de mon travail de thèse, un intérêt tout particulier sera porté sur

l'effet du NO sur la régulation de la fonction cardiaque, après un bref rappel des effets vasculaires.

2.3.1. NO et fonction vasculaire

L'effet le plus étudié du NO sur la fonction vasculaire est son action vasorelaxante endothélium-dépendante. Le NO, produit au sein des cellules endothéliales, diffuse au niveau du muscle lisse vasculaire où il active la guanylate cyclase soluble (GCs), responsable d'une synthèse de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de guanosine triphosphate (GTP). Le GMPc active la PKG qui va notamment activer le repompage du Ca^{2+} cytosolique. Cette baisse de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ va avoir comme conséquence principale de diminuer l'activité Ca^{2+} dépendante de la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*), aboutissant ainsi à une relaxation du muscle lisse vasculaire. D'autre part, le NO possède *via* ses effets bénéfiques sur l'agrégation plaquettaire et sur l'adhésion leucocytaire un effet anti-thrombotique (Ignarro *et al.*, 1999 ; pour revue).

2.3.2. NO et fonction cardiaque

Le NO joue un rôle essentiel dans la régulation de la fonction cardiaque. En effet, ce gazotransmetteur est non seulement produit par les cellules endothéliales coronaires et endocardiques, mais aussi par les cardiomyocytes. Ainsi, il intervient dans la régulation de la perfusion et de la contractilité cardiaque. Le rôle du NO sur la contractilité myocardique a fait l'objet de nombreux travaux, mais reste encore controversé de par la complexité de ses effets dépendants i) de sa concentration, ii) de sa source de production localisée (dépendante des différentes isoformes de NOS) et iii) de ses différents voies d'actions cellulaires. En effet le NO agit sur l'activité cellulaire par 2 mécanismes majeurs de signalisation : une voie GMPc-dépendante dite « indirecte », et une voie dite « directe » par

S-nitrosylation de multiples cibles cellulaires (Rastaldo *et al.*, 2007 ; Lima *et al.*, 2010 ; pour revues). De plus, le NO est rapporté comme un régulateur essentiel de la respiration mitochondriale (Brown & Borutaite, 2007), mais cela apparaît être principalement impliqué dans le cas de pathologies (Otani, 2009 ; pour revue). Les effets du NO dans la régulation de la fonction cardiomyocytaire sont résumés dans la figure I.10.

a. Voie GMPc-dépendante

Malgré de nombreuses divergences de résultats dans la littérature, il semble apparaître un consensus selon lequel de faibles concentrations de NO ($[NO] < 1 \mu M$) dans le tissu myocardique auraient un effet inotrope positif, tandis que de hautes concentrations ($[NO] > 10 \mu M$) exerceraient un effet inotrope négatif (Mohan *et al.*, 1996 ; Kodja & Kottenberg, 1999 ; Vila-Petroff *et al.*, 1999 ; Shah & MacCarthy, 2000). La principale cible cellulaire du NO est la GCs qui une fois activée induit la synthèse de GMPc, qui peut i) activer une PKG ou ii) il inhiber la phosphodiesterase III (PDE III). Lorsque présent à faibles concentrations, le GMPc inhibe la PDE III, induisant ainsi une accumulation d'AMPc cellulaire et donc une activation de la PKA. Cette activation de la voie AMPc-PKA est notamment à l'origine d'une ouverture des canaux calciques voltages dépendants (VOC) et des RyR-2, induisant de ce fait une augmentation de la contractilité myocardique liée à l'amélioration de l'amplitude du transitoire Ca^{2+} (Mery *et al.*, 1993 ; Kojda *et al.*, 1996). A l'inverse, lorsque les concentrations en NO et donc en GMPc sont plus élevées, l'activation de la voie GMPc-PKG est à l'origine d'une inhibition des VOC (Mery *et al.*, 1991). De plus, l'équipe de Shah (Layland *et al.*, 2002) a mis en évidence que l'activation de la voie NO-GMPc-PKG au niveau cardiomyocytaire a pour conséquence une désensibilisation des myofilaments au Ca^{2+} liée à la phosphorylation de la troponine I au niveau des résidus Ser²³⁻²⁴. Ainsi, les variations de la concentration intracellulaire en NO jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie calcique cellulaire au cours du CEC (Fig. I.8). De plus, Petroff *et al.* (2001) ont mis en évidence le rôle

du NO dans l'augmentation de la fonction contractile du myocarde en réponse à un stress d'étirement (mécanisme de Franck-Starling). En effet, lors d'un tel stress l'augmentation de la synthèse de NO, par l'activation Pi3k-Akt-dépendante de la eNOS, va favoriser la libération de Ca^{2+} par les RyR et ainsi accroître l'amplitude des transitoires calciques et donc la contractilité myocardique.

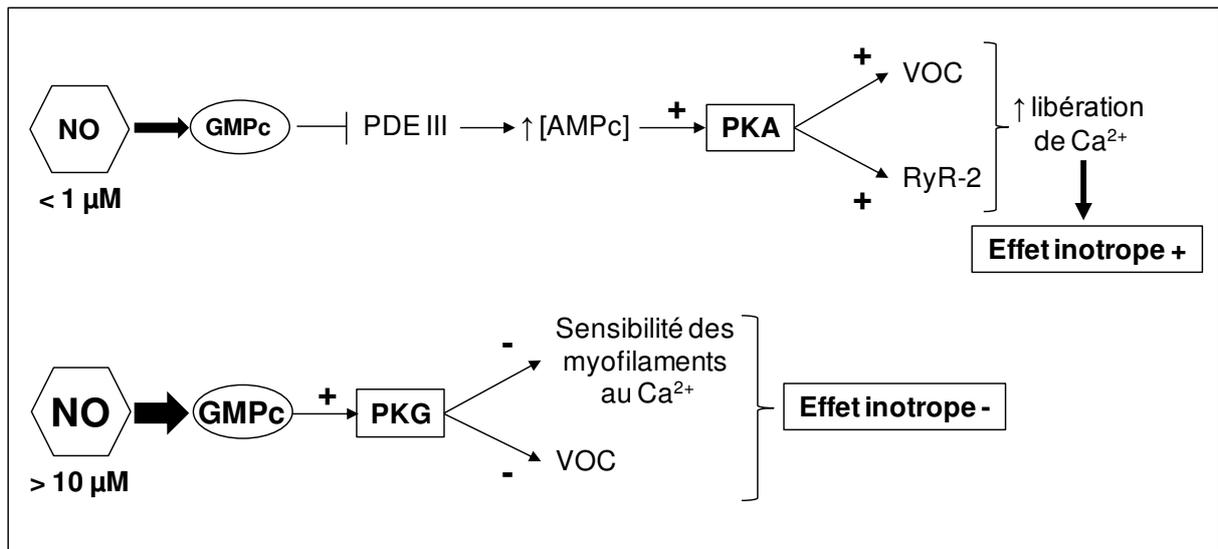


Figure I.8 : Effets du NO dans le cardiomyocyte : voie « indirecte » GMPc dépendante. NO : monoxyde d'azote ; GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique ; PDE III : phosphodiesterase III ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A ; VOC : canaux calciques voltage dépendants ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PKG : protéine kinase.

D'autre part, selon l'isoforme de NOS et donc selon sa localisation cellulaire (cavéoles *versus* RS, respectivement pour la eNOS et la nNOS) le NO produit n'interagira pas avec les mêmes cibles cellulaires et n'aura ainsi pas les mêmes effets sur la régulation de la fonction contractile (Khan *et al.*, 2003). Le NO dérivé de la nNOS est en effet rapporté dans la littérature comme impliqué de manière importante dans la modulation des flux calciques au niveau du RS (Sears *et al.*, 2003 ; Seddon *et al.*, 2007 ; pour revue), mais également des canaux calciques du sarcolemme (*L-type Ca^{2+} channel*) (Sears *et al.*, 2003). Il a aussi été montré que le NO dérivé de la nNOS était responsable d'une augmentation de l'activité des pompes SERCA-2a en favorisant la phosphorylation du PLB (Wang *et al.*, 2008) (Fig. I.9).

b. S-nitrosylation

Bien que la GCs ait été identifiée comme la première cible du NO, plus récemment il est devenu évident que le NO exerce un effet ubiquitaire dans la régulation de la fonction cardiaque par une voie GMPc-indépendante, dite « directe », liée à la S-nitrosylation d'un résidu cystéine (Lima *et al.*, 2010). La S-nitrosylation désigne la conversion par le NO d'un groupe thiol d'un résidu cystéine, pour former un S-nitrosothiol. Parmi les nombreuses cibles cellulaires de S-nitrosylation, les canaux ioniques sont particulièrement impliqués, et ce mécanisme est en parti lié à la compartimentation cellulaire des NOS (Iwakiri *et al.*, 2006). Ainsi la S-nitrosylation des RyR-2, nNOS dépendante, responsable d'une augmentation de probabilité d'ouverture du canal, a comme conséquence une augmentation de l'amplitude du transitoire calcique au cours du CEC (Xu *et al.*, 1998). De manière plus controversée, bien que la régulation des canaux calciques du sarcolemme (L-type Ca^{2+} channel) semble principalement être sous le contrôle de la eNOS (Barouch *et al.*, 2002), leur S-nitrosylation, responsable d'une inhibition de leur activité (Hu *et al.*, 1997), a été décrite comme pouvant être nNOS dépendante (Sun *et al.*, 2006). La régulation des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique par S-nitrosylation apparait jouer un rôle important dans la cardioprotection au cours de stress oxydants importants, dont l'IR (Sun *et al.*, 2006 ; 2010 ; pour revues).

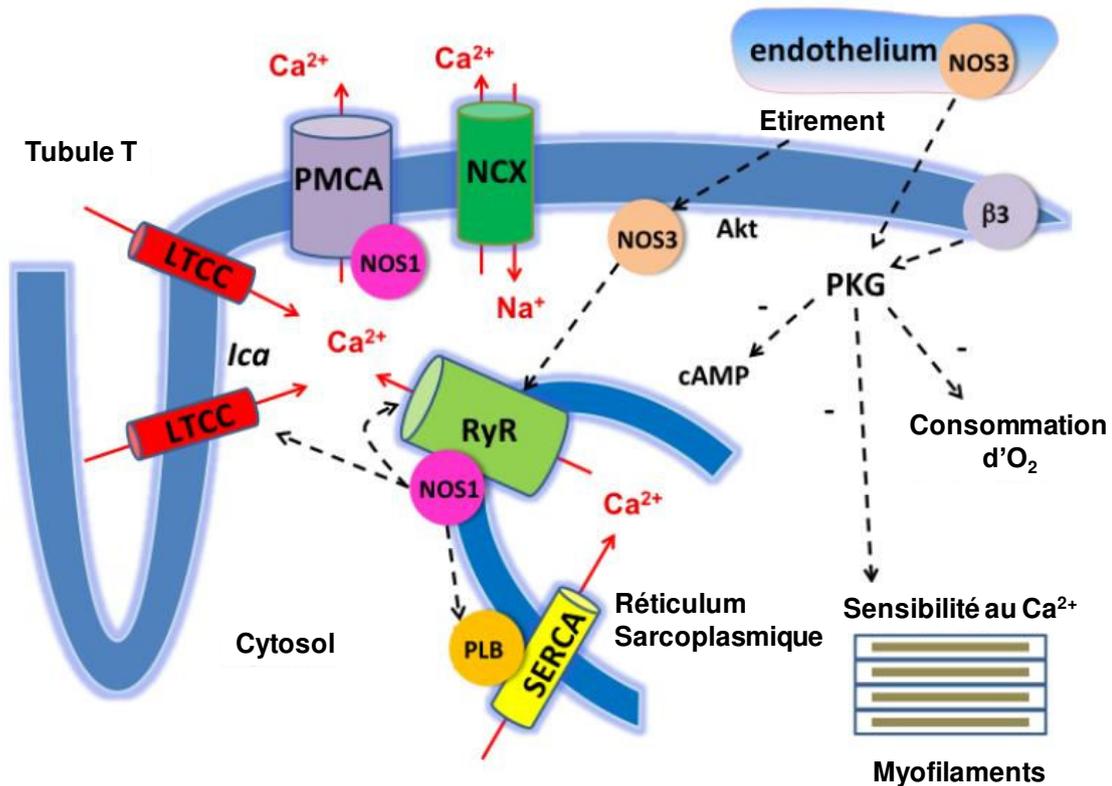


Figure I.9 : Effets autocrines et paracrines du NO synthétisé par le eNOS (NOS3) et la nNOS (NOS1).

LTCC : L-Type Ca²⁺ channel ; PMCA : plasmalemma Ca²⁺-ATPase ; NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺ ; RyR : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Adapté de Carnicer *et al.*, 2012.

c. NO et mitochondrie

Enfin, le NO régule la fonction myocardique en se fixant sur la chaîne respiratoire mitochondriale (Brown & Borutaite, 2007 ; pour revue). En effet, le NO peut inhiber de manière réversible la chaîne de transport des électrons en se fixant sur l'hème ferrique de la cytochrome-c oxydase, empêchant alors la fixation de l'O₂ (Brown, 1995). En condition physiologique ([NO] < 1 μM), ce mécanisme régule la synthèse d'ATP et à pour conséquence une faible production d'O₂⁻, impliquée dans des voies de signalisation cardiaques. En condition de stress pathologique, l'inhibition de la respiration mitochondriale par le NO semble pouvoir constituer un élément clef de cardioprotection (Korge *et al.*, 2008 ; pour revue). Cependant, l'altération de la chaîne de transfert des électrons mitochondriale

liée à une production plus importante de NO par la iNOS a été rapportée comme pouvant être à l'origine du déclenchement de voies pro-apoptotiques, ou aboutissant à la nécrose cellulaire (Brown & Borutaite, 2002 ; Chen *et al.*, 2002). Ce point sera développé dans la partie suivante.

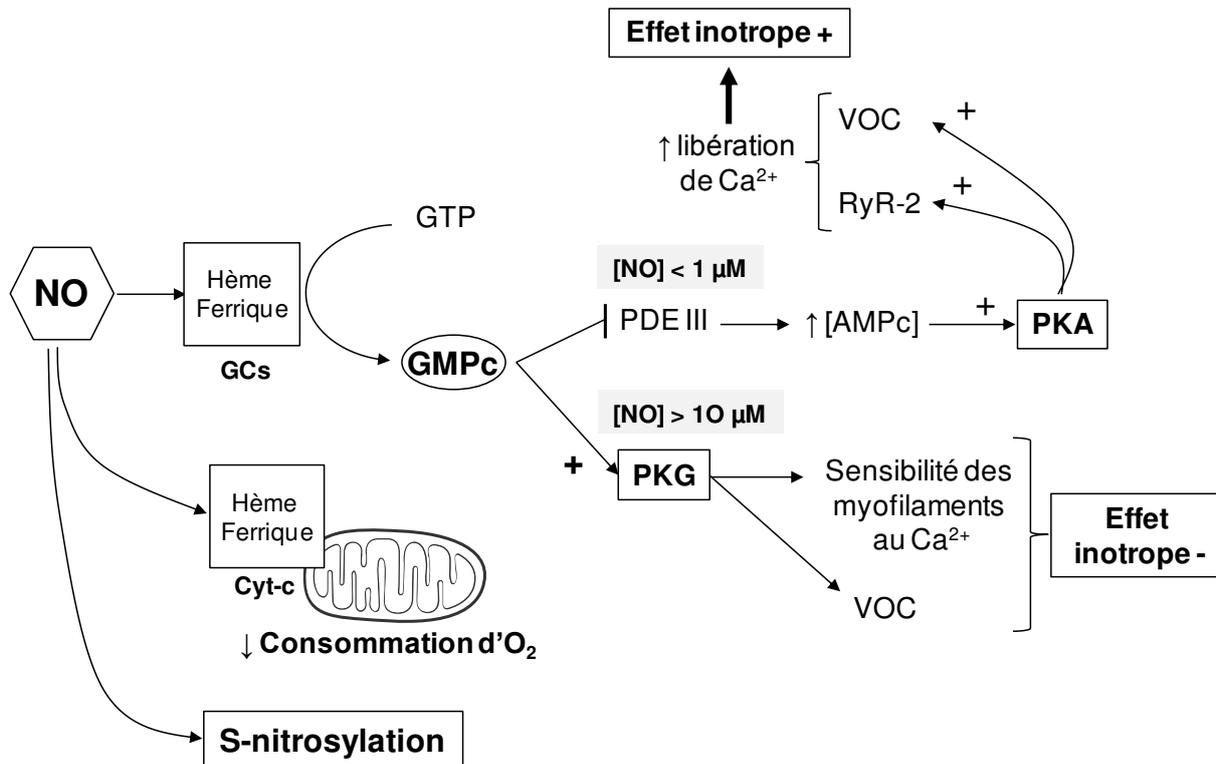


Figure I.10 : Effets du NO dans la régulation de la fonction cardiomyocytaire. NO : monoxyde d'azote ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GTP : guanosine tri-phosphate ; GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique ; PDE III : phosphodiesterase III ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A ; VOC : canaux calcique voltage dépendants ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PKG : protéine kinase G ; Cyt-c : cytochrome-c oxydase. Adapté de Shah & Mac Carthy, 2000.

2.4. NO et ischémie-reperfusion myocardique

Le rôle du NO dans la sévérité des lésions d'IR myocardique a fait l'objet de multiples controverses. En effet, alors que son rôle bénéfique dans la limitation des lésions de reperfusion semble faire consensus lorsqu'il est produit à des concentrations physiologiques (Cohen *et al.*, 2006 ; Sun & Murphy, 2010), certaines études rapportent tout de même qu'il

peut s'avérer hautement toxique lorsqu'en condition pro-oxydante, il réagit avec l' $O_2^{\cdot-}$ pour former du $ONOO^-$ (Pacher *et al.*, 2007). Ce phénomène apparait notamment pouvoir être renforcé par l'état de découplage des NOS, favorisant ainsi la colocalisation entre la production de NO et d' $O_2^{\cdot-}$. Dès lors, la régulation de l'état de couplage de la eNOS au cours de l'IR semble pouvoir constituer une cible privilégiée dans le développement de stratégies de cardioprotection (Moens & Kass, 2006 ; pour revue).

2.4.1. Effets bénéfiques du NO au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique

Au niveau vasculaire, l'effet bénéfique du NO au cours de l'IR a été largement démontré puisqu'il contribue au maintien de la perfusion myocardique en limitant le phénomène de « *no reflow* », et prévient l'agrégation plaquettaire ainsi que l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium (Lefer *et al.*, 1993 ; Pabla *et al.*, 1996 ; Gewaltig & Kojda, 2002).

Au niveau cardiaque, bien que de nombreuses divergences subsistent sur le rôle protecteur du NO dans la cardioprotection, l'amélioration ou le maintien fonctionnel de la voie métabolique du NO par la eNOS au cours de l'IR ont été largement rapportés comme réduisant la sévérité des lésions de reperfusion. En effet, divers travaux ont montré que l'administration de donneurs de NO au cours de l'IR induit une diminution de la taille de la zone infarctée et une meilleure récupération fonctionnelle au cours de la reperfusion post-ischémique (Takano *et al.*, 1998 ; Cohen *et al.*, 2006). De même, différents modèles permettant d'induire une surexpression myocardique de eNOS ont été fréquemment rapportés comme cardioprotecteurs (Brunner *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2004 ; Elrod *et al.*, 2006 ; Szelid *et al.*, 2010). Toutefois, les conclusions quant au rôle de la synthèse de NO par les NOS semblent plus controversées dans les études induisant une inhibition de l'activité catalytique de ces enzymes, que ce soit à partir de modèles transgéniques ou pharmacologiques (Schulz *et al.*, 2004 ; pour revue). Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par les variations des concentrations d'inhibiteur employées ou par la mise en

place de mécanismes de compensation entre les différentes isoformes de NOS. Au niveau cardiomyocytaire, bien que les mécanismes par lesquels le NO est à l'origine d'une cardioprotection ne soient pas totalement élucidés, il semblerait que ceux-ci soient liés à i) l'action du NO au niveau mitochondrial et ii) la S-nitrosylation des protéines mitochondriales et/ou régulant l'homéostasie calcique cellulaire (Sun & Murphy, 2010 ; pour revue).

Par ailleurs, il est clairement établi dans la littérature que le NO contribue à la cardioprotection associée aux stratégies de pré- et de post-conditionnement (Sun *et al.*, 2007 ; Pagliaro *et al.*, 2011 ; pour revues). Notamment, divers études ont rapporté qu'en présence d'inhibiteur de NOS, les effets bénéfiques de ces stratégies sur la sensibilité du cœur à l'IR étaient abolis, suggérant la participation requise de la voie NOS-NO dans la mise en place des mécanismes cardioprotecteurs de pré- et de post-conditionnement (Jones & Bolli, 2006 ; pour revue).

a. Effets cardioprotecteurs du NO sur la fonction mitochondriale

La mitochondrie est une cible primordiale des différentes stratégies de cardioprotection. En effet, cet organite cellulaire est considéré comme la première source cardiomyocytaire de RLO et joue un rôle clef dans l'induction de l'apoptose cellulaire (Di Lisa *et al.*, 2007 ; pour revue). Comme évoqué précédemment, le NO peut inhiber de manière réversible la respiration mitochondriale en se fixant sur l'hème ferrique de la cytochrome c oxydase, empêchant ainsi la fixation de l'O₂ (Brown, 1995). Or, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale peut constituer un élément clef de cardioprotection (Chen *et al.*, 2007). De manière intéressante, son inhibition par le NO a été rapportée comme permettant de réduire la production excessive de RLO suite à la remise en activité de l'organite au cours de la reperfusion, et ainsi de limiter leur production par les complexes protéiques altérés de la chaîne respiratoire mitochondriale (Heusch *et al.*, 2008 ; Korge *et al.*, 2008). D'autre part, Sasaki *et al.* (2000) ont montré un effet cardioprotecteur majeur du NO *via* l'activation du

canal potassique mitochondrial mK_{ATP} (O'Rourke, 2004). Ce phénomène résulte de l'activation de la voie GMPc/PKG qui active l'ouverture du canal mK_{ATP} au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Oldenburg *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2004). L'ouverture de ce canal a alors comme conséquence une dépolarisation de cette membrane, limitant ainsi la surcharge calcique mitochondriale et inhibant donc l'ouverture du mPTP (Heusch *et al.*, 2008).

b. S-nitrosylation et cardioprotection

La S-nitrosylation protéique est récemment apparue comme un acteur majeur de la cardioprotection induite par le NO (Cohen *et al.*, 2010 ; Sun & Murphy, 2010 ; pour revues). En effet, non seulement la S-nitrosylation protéique peut modifier l'activité de protéines cibles, mais peut aussi protéger les groupements thiols d'une oxydation irréversible. Par conséquent, ce mécanisme semble favoriser le maintien fonctionnel de nombreuses protéines cellulaires qui pourraient être altérées par le stress oxydant au cours de l'IR (Sun *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que lors de stratégie de cardioprotection, les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale mais aussi les protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique sont des cibles privilégiées de la S-nitrosylation (Sun & Murphy, 2010). En effet, la S-nitrosylation des complexes I et V (Burwell *et al.*, 2006) et de la cytochrome c oxydase (Zhang *et al.*, 2005) a pour conséquence une réduction de la production de RLO au cours de l'IR. Au niveau du RS, la S-nitrosylation des RyR-2 permet d'une part de protéger l'oxydation du canal, et donc de limiter les fuites pathologiques de Ca^{2+} du RS, et d'autre part favorise sa probabilité d'ouverture (Xu *et al.*, 1998 ; Gonzales *et al.*, 2007). Ceci, associé à l'augmentation de l'activité des SERCA-2a par S-nitrosylation (Sun *et al.*, 2007), permet de limiter la surcharge calcique au cours de l'IR. Enfin, la S-nitrosylation semble également participer à la cardioprotection *via* une modulation de

l'activation de voies de signalisations pro-apoptotiques, telle que notamment celle de la caspase 3 (Kim *et al.*, 1997 ; Maejima *et al.*, 2005) (Fig. I.11).

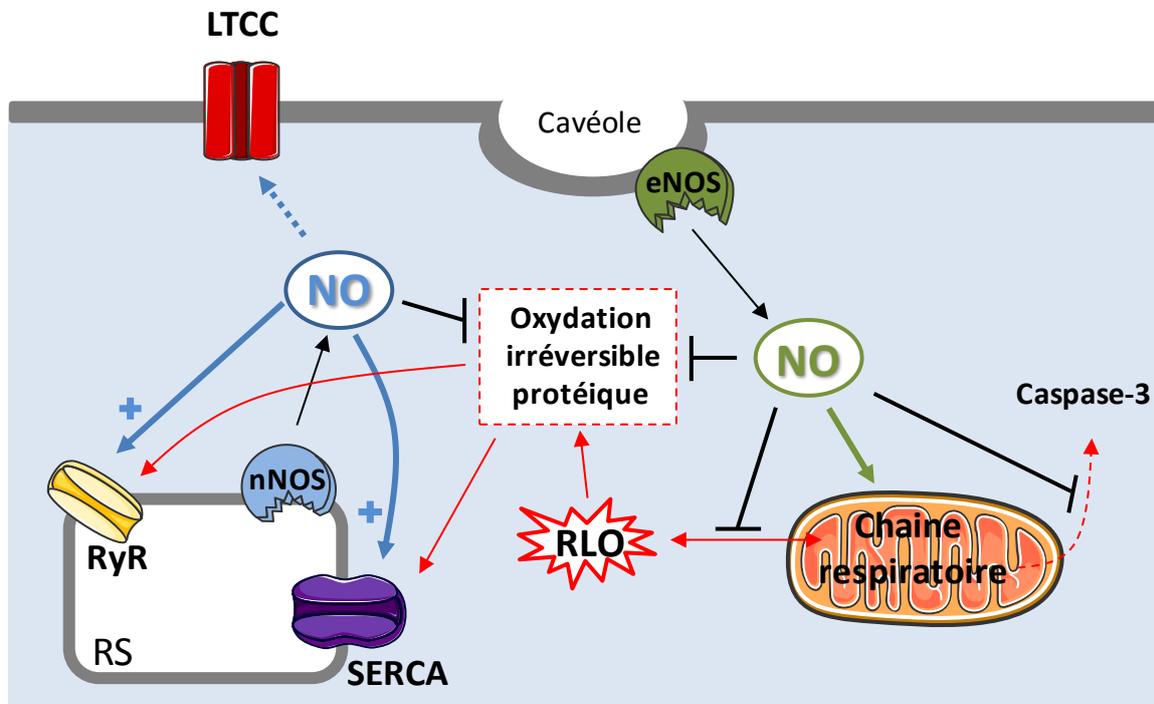


Figure I.11 : Voies de cardioprotection par S-nitrosylation. NO : monoxyde d'azote ; nNOS : nitrique oxyde synthétase neuronale ; eNOS : nitrique oxyde synthétase endothéliale. LTCC : L-Type Ca²⁺ channel ; RyR : récepteur à la ryanodine ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène.

2.4.2. Effets délétères du NO au cours de l'ischémie-reperfusion myocardique

Les divergences de la littérature sur les effets bénéfiques ou délétères du NO dans l'IR myocardique semblent dépendre de la concentration de NO et de sa propension à réagir avec l'O₂⁻, pour former du ONOO⁻ (Pacher *et al.*, 2007). Dès lors, les effets bénéfiques ou non de l'inhibition de la eNOS ou des NOS au cours de l'IR sont sujets à controverses dans la littérature.

Ainsi, une concentration élevée de NO semble être délétère notamment *via* son action sur la mitochondrie (Davidson & Duchon, 2006 ; Brown & Borutaite, 2007). En effet, à de fortes concentrations, le NO peut inhiber de manière importante et prolongée la chaîne respiratoire mitochondriale, résultant d'une part en une réduction de la production d'ATP, et d'autre part en une augmentation de la synthèse de RLO associée à l'induction de l'ouverture du mPTP. La déplétion énergétique ainsi générée participe à la nécrose cellulaire de reperfusion (Leist *et al.*, 1999). Bien qu'à des concentrations physiologiques l'inhibition du complexe I par le NO ait été rapportée comme limitant la production de RLO, de nombreux travaux ont à l'inverse montré que celle-ci était responsable d'une aggravation de la production d'O₂⁻ par la mitochondrie. Cette production de RLO participerait à l'induction de la voie de l'apoptose en stimulant l'ouverture du mPTP et la libération de cytochrome c (Jekabsone *et al.*, 2003).

D'autre part, il est intéressant de noter que le rôle de la iNOS, responsable d'une synthèse de NO jusqu'à 100 fois supérieure à celle des NOS constitutives, reste controversé. En effet, alors que celle-ci semble jouer un rôle essentiel dans le phénomène de préconditionnement ischémique (Imagawa *et al.*, 1999 ; Bolli, 2001) et que son induction au niveau cardiomyocytaire ait été rapportée comme cardioprotectrice (West *et al.*, 2008), de nombreuses études ont toutefois mis en évidence son rôle non négligeable dans la sévérité des lésions de reperfusion (Wildhirt *et al.*, 1997 ; Han *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007).

2.4.3. eNOS et ischémie-reperfusion myocardique

L'amélioration de la voie de synthèse du NO par la eNOS constitue une cible privilégiée de différentes stratégies thérapeutiques impliquées dans le traitement de nombreuses cardiopathies telles que l'insuffisance cardiaque, les pathologies hypertensives et l'IR (Tiefenbacher *et al.*, 2000 ; Brunner *et al.*, 2003 ; Masano *et al.*, 2008). En effet, le

découplage de la eNOS a été rapporté comme jouant un rôle majeur dans la sévérité des lésions cardiovasculaires (Moens & Kass, 2006 ; Roe & Ren, 2012), et de ce fait le maintien de son état fonctionnel, notamment par une administration de BH₄, semble pouvoir constituer un élément clef de thérapeutique cardiovasculaire.

a. Découplage de la eNOS, ONOO⁻ et ischémie-reperfusion myocardique

En condition pro-oxydante, telle que rencontrée au cours de l'IR, l'oxydation du BH₄ principalement, mais aussi des complexes hèmes, zinc et Ca²⁺/CaM nécessaires à la stabilité du dimère, induit une monomérisation de la eNOS qui produit alors de l'O₂⁻ (Xia, 2007 ; Zweier *et al.*, 2011). Cet O₂⁻ réagit avec le NO pour former du ONOO⁻. Lorsque leur synthèse est colocalisée, le NO et l'O₂⁻ se combinent de manière spontanée et quasiment inévitable du fait de leur très haute affinité. En effet, la vitesse de réaction du NO avec l'O₂⁻ est évaluée à environ 6.7*10⁹ mol⁻¹.s⁻¹, alors que la vitesse de dismutation de l'O₂⁻ par la SOD est estimée à 2*10⁹ mol⁻¹.s⁻¹. Le NO est ainsi rapporté dans la littérature comme la molécule biologique ayant la vitesse de réaction avec l'O₂⁻ la plus rapide. Ainsi, en situation pro-oxydante, lorsqu'il est produit en concentration suffisante le NO favorise la production de ONOO⁻ plutôt que la dismutation de l'O₂⁻ par la SOD (Pacher *et al.*, 2007). Dès lors, dans un contexte pathologique, la colocalisation de eNOS fonctionnelles et dysfonctionnelles (couplées et découplées, respectivement productrices de NO et O₂⁻) crée les conditions optimales à la formation de ONOO⁻, faisant du découplage de cette enzyme une cible thérapeutique stratégique. Dans le cadre de l'IR myocardique, la formation de ONOO⁻ est clairement établie comme jouant un rôle décisif dans la gravité des lésions de reperfusion. Les études de Wang *et al.* (1996) ainsi que Yasmin *et al.* (1997) ont été les premières à démontrer, sur cœur isolé, l'implication du ONOO⁻ dans la sévérité des lésions. Ces résultats sont aujourd'hui unanimement reconnus dans la littérature (Zweier *et al.*, 2001 ; Pacher *et al.*, 2007 ; pour revues). Depuis, diverses études ont mis en évidence que toute stratégie

permettant de diminuer la synthèse et/ou l'action du ONOO^- permettait de réduire la sensibilité du myocarde à l'IR (Jiao *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2008). Par conséquent, limiter le découplage de la eNOS est apparu comme une stratégie efficace de cardioprotection. Pour cela, la méthode la plus reconnue dans la littérature est l'administration de BH_4 .

b. BH_4 et ischémie-reperfusion myocardique

Les effets bénéfiques d'une supplémentation en BH_4 , ou de son précurseur la sépiaptérine, sur la sensibilité du cœur à l'IR ont été largement rapportés, que ce soit au niveau du réseau artériel coronaire, de l'organe isolé, ou à l'échelle cellulaire (Verma *et al.*, 2002). Au niveau vasculaire, cette stratégie pharmacologique a été rapportée comme permettant de limiter la dysfonction endothéliale (Tiefenbacher *et al.*, 1996) et ainsi d'améliorer la perfusion coronarienne post-ischémique (Dumitrescu *et al.*, 2007). Au niveau myocardique, il a été observé *in-vivo*, qu'une injection intraveineuse de BH_4 ou de sépiaptérine permettait de réduire la sensibilité du myocarde à l'IR (Tiefenbacher *et al.*, 2003 ; Wajima *et al.*, 2006). De manière intéressante, cet effet bénéfique a été obtenu par Yamashiro *et al.* (2002) sur un modèle de cœur isolé perfusé avec une administration de BH_4 dans le perfusat 5 minutes avant et après la période d'ischémie. Dans toutes ces études, une augmentation de la synthèse de NO et /ou une réduction de la production d' O_2^- sont rapportées comme expliquant les effets bénéfiques de ce type de stratégie. Enfin, An *et al.* (2009) ont observé que les rats Brown Norway, notamment caractérisés par une surexpression de GCH-1 (l'enzyme impliquée dans la synthèse de BH_4), ont une meilleure tolérance à l'IR myocardique du fait d'un meilleur maintien du ratio BH_4/BH_2 au cours de l'IR, associé à une moindre production d' O_2^- . Par ailleurs, l'administration chronique de BH_4 a été rapportée comme permettant de limiter le remodelage pathologique du myocarde après un infarctus (Masano *et al.*, 2008), ou dans le cadre d'une surcharge pressive (Moens *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces travaux met donc en évidence les potentiels effets cardioprotecteurs du maintien de l'état fonctionnel de la eNOS au cours de divers stress et/ou pathologies. Par ailleurs, il est intéressant de noter que, si de nombreuses études rapportent la surexpression de eNOS dans différents tissus comme pouvant être un vecteur intéressant de cytoprotection, cette surexpression peut, si elle est associée à un découplage fonctionnel de la eNOS, devenir délétère. Elrod *et al.* (2006) ont en effet rapporté que sur une population de rats diabétiques subissant une IR hépatique, une surexpression de eNOS s'accompagne d'une aggravation de la production de ONOO^- , du fait de son état découplé dans cette pathologie. Dans cette étude, lorsqu'une supplémentation en BH_4 est réalisée, la surexpression génique devient alors cardioprotectrice. Aussi, dans une étude sur laquelle nous reviendrons, de Waard *et al.* (2009) ont démontré que la surexpression de eNOS dans un modèle de souris transgéniques entrainées est responsable d'une aggravation du remodelage cardiaque post-infarctus, et ce à cause d'une exacerbation du stress oxydant lié au découplage de la eNOS.

Par ailleurs, de manière originale, Zweier *et al.* (2011) proposent que le découplage fonctionnel temporaire de la eNOS puisse être potentiellement bénéfique en condition pro-oxydante. En effet, ce découplage permettrait, en réduisant la production de NO en condition pro-oxydante, de limiter la synthèse de ONOO^- , et donc l'oxydation irréversible de certaines cibles cellulaires.

II. EXERCICE ET CARDIOPROTECTION

Les effets bénéfiques pour la santé d'une pratique régulière non épuisante d'exercices physiques sont largement rapportés depuis une trentaine d'années. Dès les années 80, de nombreuses études épidémiologiques ont en effet mis en évidence une réduction de la mortalité et de la morbidité avec une pratique régulière d'activité physique (Paffenbarger, 1986 ; O'Connor *et al.*, 1989 ; Lee & Paffenbarger, 2000 ; Myers *et al.*, 2002 ; Ignarro *et al.*, 2007). Aujourd'hui la pratique d'une activité physique régulière fait partie des recommandations de l'OMS qui préconise une pratique physique quotidienne de 30 minutes à une intensité modérée. Les effets biologiques d'une telle pratique sont complexes, et restent encore mal compris. Dans le cadre de ce travail nous nous centrerons évidemment uniquement sur les effets cardiovasculaires. Ainsi, la pratique régulière d'une activité physique en endurance est rapportée comme étant à l'origine i) d'une amélioration de la fonction cardiaque (Moore *et al.*, 1993 ; Kemi & Wisloff, 2010), ii) d'un remodelage cellulaire à l'origine du développement d'un phénotype cardioprotégé (Powers *et al.*, 2008 ; pour revue) et iii) de l'amélioration de la récupération fonctionnelle myocardique post-infarctus (Wisloff *et al.*, 2002 ; Aït Mou *et al.*, 2009). L'étude de ces effets bénéfiques a permis de faire ressortir un certain nombre de cibles moléculaires et de mécanismes physiologiques impliqués dans la cardioprotection par l'exercice. Bien qu'il soit difficile de résumer les effets bénéfiques de l'exercice à certaines cibles moléculaires, au niveau cardiaque il semble aujourd'hui apparaître un consensus concernant le rôle i) de l'homéostasie calcique cellulaire, lié notamment aux effets bénéfiques de l'exercice sur l'activité et/ou l'expression des protéines régulatrices des flux calciques lors du CEC (French *et al.*, 2006 ; 2008) et ii) de l'amélioration de la capacité enzymatique antioxydante myocardique (Demirel *et al.* 2001 ; Ramires *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2004). Par ailleurs, au niveau de la fonction vasculaire, il est clairement établi que les effets bénéfiques de l'exercice sont expliqués par une amélioration de la voie de synthèse du NO par la eNOS (Johnson *et al.*, 2001 ; Kojda &

Hambrecht, 2005). Mais ce n'est que très récemment que le rôle potentiel de la eNOS cardiomyocytaire dans la cardioprotection par l'exercice a été évoqué. En effet, alors que le rôle clef de cette enzyme est largement rapporté dans la modulation de la sensibilité du myocarde à l'IR, et malgré la reconnaissance des effets de l'exercice sur l'augmentation de son expression et/ou de son activité, son implication dans la cardioprotection par l'exercice n'a été abordée pour la première fois qu'en 2011 (Calvert *et al.*, 2011). Par conséquent, la compréhension de son rôle au cours de l'IR reste non investiguée à ce jour.

1. Effets de l'exercice sur le cœur

Les études cliniques de la fonction myocardique par échocardiographie ont permis de mettre en évidence un remodelage morphologique caractérisé par une hypertrophie harmonieuse, associée à une amélioration de la fonction systolique et diastolique du myocarde au repos et à l'effort chez des athlètes (Pluim *et al.*, 2000 ; Nottin *et al.*, 2008). Ces adaptations fonctionnelles ont été étudiées expérimentalement sur des modèles de laboratoire, notamment de rongeurs, et sont présentées dans les parties suivantes.

1.1. Effets de l'exercice sur la contractilité myocardique et l'homéostasie calcique

Dès les années 70, il a été mis en évidence sur cœur isolé-perfusé de rat une amélioration de la performance contractile du myocarde avec un entraînement en natation (Penpargkul & Sheuer, 1970 ; Bersohn & Scheuer, 1977). Par la suite, de nombreux travaux réalisés sur cardiomyocytes isolés ont investigué les mécanismes impliqués dans l'amélioration de la contractilité cardiaque avec l'exercice. Ainsi, au début des années 90, Moore *et al.* (1993) montrent qu'un exercice en endurance permet d'améliorer la fonction contractile au niveau du cardiomyocyte *via* une amélioration des mouvements calciques au

cours du CEC. Un peu plus tard, Palmer *et al.* (1998) confirment l'amélioration des mouvements calciques cardiomyocytaires avec l'exercice, et au début des années 2000, Wisloff *et al.* (2001) démontrent, dans une très belle étude, qu'un entraînement aérobie par intermittence améliore la contractilité des cardiomyocytes grâce à une sensibilité accrue des myofilaments au Ca^{2+} , ainsi qu'à une amélioration des cinétiques de re-séquestration du Ca^{2+} dans le RS. Ce résultat est expliqué, dans ce travail, par une augmentation de l'expression des pompes SERCA-2a. Ces résultats ont ensuite été étayés par les travaux de Kemi *et al.* (2007 ; 2008) qui ont montré que l'amélioration des cinétiques de repompage du Ca^{2+} pouvait être expliquée par l'augmentation du niveau de phosphorylation du PLB, ayant comme conséquence une augmentation de l'activité des SERCA-2a. Enfin, l'emploi d'un modèle de cardiomyocytes isolés pelés, permettant de contrôler la concentration calcique intracellulaire, a également permis à Diffie *et al.* (2001) de démontrer une amélioration de la sensibilité au Ca^{2+} des myofilaments chez des rats exercés en endurance. Par ailleurs, Diffie & Nagle (2002) ont montré, sur un même modèle de cardiomyocytes isolés pelés, que l'exercice était à l'origine d'une amélioration de la sensibilisation au Ca^{2+} des myofilaments au cours d'un étirement de la machinerie contractile, suggérant ainsi une amélioration avec l'exercice de la relation de Frank-Starling.

1.2. Effets de l'exercice sur la eNOS

Les effets de l'exercice sur la eNOS ont été étudiés dans un premier temps au niveau vasculaire. En effet, depuis les années 80, les adaptations fonctionnelles vasculaires à l'exercice ont fait l'objet d'un intérêt croissant, permettant ainsi de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'exercice sur l'augmentation de la compliance des grosses artères, notamment associée à une amélioration de la vasorelaxation endothélium-dépendante (Delp *et al.*, 1993) due à une augmentation de l'activité de la voie NO/GMPc (McAllister *et al.*, 2008 ; pour revue). Il est effectivement clairement établi aujourd'hui que l'exercice est

responsable d'une amélioration de la voie de synthèse du NO par la eNOS au niveau des cellules endothéliales vasculaires (Johnson *et al.*, 2001). En effet, selon les études, l'exercice est couramment associé à une augmentation du niveau de phosphorylation de la eNOS au niveau de son site d'activation (résidu Ser¹¹⁷⁷) et/ou à une augmentation de son expression, faisant de la eNOS une cible privilégiée des adaptations vasculaires à l'exercice (Green *et al.*, 2004 ; Zang *et al.*, 2009 ; Barbosa *et al.*, 2012). Ceci semble être principalement expliqué par la récurrence des forces de cisaillement, ou « *shear stress* », qui s'appliquent aux parois artérielles (Uematsu *et al.*, 1995 ; Davis & Cai, 2001 ; Balligand *et al.*, 2009). La transduction de ces contraintes mécaniques est réalisée par un ensemble de protéines extracellulaires, transmembranaires et intracellulaires, mécanosensibles, dont notamment les protéines PECAM (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules*) qui sont les molécules d'adhésion intercellulaires les plus répandues des cellules endothéliales, ainsi que les intégrines et les cavéolines associées aux cavéoles (Yu *et al.*, 2006 ; Balligand *et al.*, 2009). D'autre part, il est également rapporté que le stress oxydant généré au cours d'une pratique chronique d'exercice en endurance peut être responsable d'une stimulation de la voie de la eNOS (Drummond *et al.*, 2000 ; Lauer *et al.*, 2005).

Dans la continuité de ces études, les effets de l'exercice sur la eNOS au niveau du tissu myocardique ont par la suite été évalués, mais restent à ce jour encore assez peu documentés. En accord avec les effets vasculaires de l'exercice, il a été montré que les contraintes mécaniques, ou plus spécifiquement d'étirement (« *stretch stress* ») au niveau cardiaque, sont responsables d'une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS myocardique. La mise en évidence de cette adaptation a essentiellement été abordée dans des études s'intéressant aux effets de l'exercice sur la pathologie. Ainsi, Grijalva *et al.* (2008) rapportent, dans un modèle de rats diabétiques, une augmentation de l'expression de la eNOS chez les rats entraînés lorsque comparés à leurs homologues sédentaires. D'autre part, Akita *et al.* (2007), dans une étude s'intéressant aux effets cardioprotecteurs sur l'IR d'une pratique d'exercice réalisée pendant seulement 7 jours, montrent chez les souris

exercées une augmentation de l'état phosphorylé de la eNOS au niveau du résidu Ser¹¹⁷⁷ ainsi qu'une augmentation de l'expression totale de eNOS. Ces auteurs rapportent aussi une rapide normalisation de ces paramètres après l'arrêt de l'exercice. Enfin, dans une étude sur laquelle nous reviendrons en détails, Calvert *et al.* (2011) relatent une augmentation de eNOS-P^{Ser1177} cardiomyocytaire suite à un entraînement volontaire de 4 semaines dans un modèle de souris. Ces auteurs rapportent que cette augmentation de phosphorylation est dépendante d'une stimulation catécholaminergique des récepteurs β_3 -AR puisque ce phénomène n'est pas observé chez des souris β_3 -AR *knock-out*.

1.3. Effets de l'exercice sur le statut antioxydant myocardique

La production de RLO au cours d'un exercice physique semble être un élément clef à l'origine d'une augmentation du statut antioxydant dans les cœurs entraînés. En effet, initialement observé sur le muscle squelettique lors de pratiques physiques exhaustives (Davies *et al.*, 1982 ; Powers & Jackson, 2008), de nombreux travaux ont ensuite observé qu'une séance d'exercice modéré était aussi responsable d'une légère production de RLO du fait de la sollicitation du métabolisme aérobie. La récurrence de ce faible stress oxydant serait responsable d'adaptations cellulaires dont l'amélioration du statut enzymatique antioxydant cellulaire (Kodja & Hambrecht, 2005 ; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008 ; Powers & Jackson, 2008). Ces résultats ont été confirmés au niveau du muscle cardiaque, avec principalement une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la SOD (Yamashita *et al.*, 1999 ; Hamilton *et al.*, 2004). Comme nous le verrons dans la partie suivante de ce manuscrit, l'amélioration du statut enzymatique antioxydant est un facteur clef de la cardioprotection induite par l'exercice en endurance (Powers *et al.*, 1998 ; Hamilton *et al.*, 2003).

L'ensemble des principaux effets de l'exercice physique chronique sur les cibles cellulaires du système cardiovasculaire est résumé dans la figure I.12.

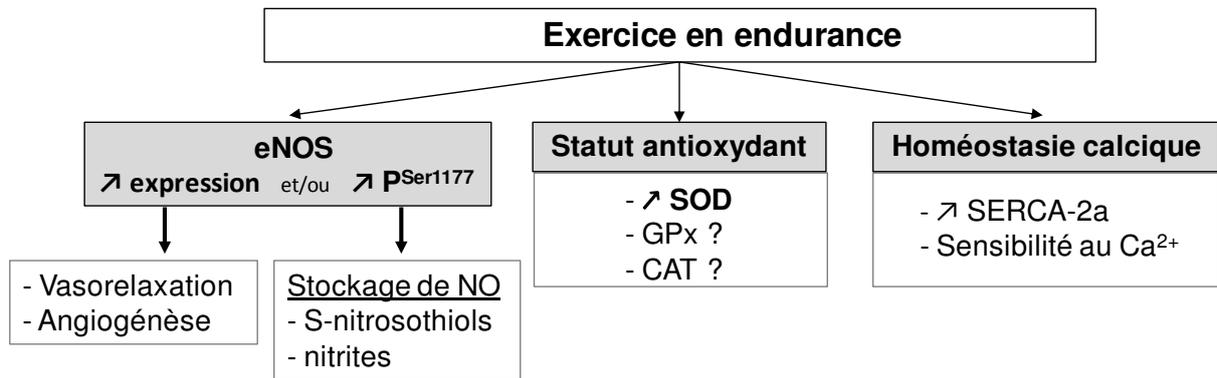


Figure I.12 : Principales cibles cellulaires des adaptations à l'exercice en endurance sur le système cardiovasculaire.

2. Effets cardioprotecteurs de l'exercice

L'exercice est à ce jour clairement reconnu comme une stratégie efficace de prévention primaire et secondaire dans de nombreuses pathologies chroniques (maladies cardiovasculaires, diabète, cancer, hypertension, obésité) (Warburton *et al.*, 2006 ; pour revue). Notamment, dans le cadre des maladies coronariennes, incluant l'infarctus du myocarde, l'exercice est progressivement apparu comme étant une stratégie efficace de cardioprotection (Ascensão *et al.*, 2007 ; Powers *et al.*, 2008 ; pour revues). Dans ce travail, nous porterons un intérêt particulier sur la prévention primaire, ou préconditionnement par l'exercice, et n'évoquerons que brièvement les effets positifs de l'exercice sur le remodelage post-IR, bien que ceux-ci soient importants et largement décrits. L'ensemble des mécanismes impliqués dans la cardioprotection primaire par l'exercice est résumé dans la figure I.13.

2.1. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle de la perfusion myocardique

Bien qu'il ne s'agisse pas d'un élément d'intérêt majeur dans le travail présenté ici, nous ne pouvons ignorer le rôle potentiellement bénéfique de l'exercice sur la circulation artérielle coronaire au cours de l'IR. En favorisant l'angiogénèse et ainsi la densité capillaire du tissu myocardique (White *et al.*, 1998 ; Laughlin *et al.*, 2012) l'exercice peut probablement permettre d'améliorer la tolérance cardiaque à l'IR, notamment en favorisant la perfusion collatérale du tissu ischémié. Aussi, l'amélioration avec l'exercice de la vasomotricité artérielle régulée par la production endothélium-dépendante de NO (Sessa *et al.*, 1994 ; Laughlin *et al.*, 2012), associée à l'amélioration des capacités antioxydante (Powers *et al.*, 2008), peut contribuer à limiter le phénomène de « *no-reflow* » au moment de la reperfusion. Par ailleurs, de nombreuses études ont rapporté que l'entraînement conduit chez des sujets atteints de maladie coronarienne chronique post-ischémique, était à l'origine d'une amélioration de la perfusion coronaire, notamment grâce à une amélioration de la voie de synthèse de NO par la eNOS (Griffin *et al.*, 1999 ; Hambrecht *et al.*, 2003 ; Zhou *et al.*, 2010). Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée au rôle de la circulation artérielle coronaire dans les effets cardioprotecteurs primaires de l'exercice.

2.2. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle du statut enzymatique antioxydant myocardique

Comme nous l'avons présenté en amont, l'exercice chronique en endurance est couramment rapporté comme induisant une amélioration de la capacité antioxydante enzymatique du myocarde. Etant donné le rôle majeur du stress oxydant dans les lésions d'IR, il semble évident que l'exercice puisse avoir un effet cardioprotecteur. Ainsi en 1998, l'équipe de Powers *et al.* (1998) montrent que la réduction de la sensibilité du myocarde à l'IR chez des rats entraînés en endurance, est associée à une augmentation de l'activité de la MnSOD et de la Cu-ZnSOD myocardiques. L'augmentation de l'activité et/ou de

l'expression de la SOD est à ce jour largement reconnue comme un élément majeur de la cardioprotection par l'exercice (Yamashita *et al.*, 1999 ; Hamilton *et al.*, 2001 ; 2003 ; Ramires & Ji, 2001 ; French *et al.*, 2006). L'état de l'art fait apparaître un consensus quant au rôle de la MnSOD dans la cardioprotection par l'exercice, par contre des divergences subsistent à propos de la CuZnSOD. En effet, alors que certaines d'études ne montrent aucun effet de l'exercice sur cette enzyme (Demirel *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2001), d'autres études rapportent que l'exercice améliore son activité et/ou son expression (Powers *et al.*, 1998 ; Calvert *et al.*, 2011). Enfin, des augmentations d'activité de la GPx (Hamilton *et al.*, 2001 ; Ramires & Ji, 2001) et plus rarement de la CAT (French *et al.*, 2006) peuvent également être associées à la pratique régulière d'un exercice. Comme l'exposent Ascensão *et al.* (2007) dans leur revue, ces divergences de résultats peuvent être imputées aux variations des modèles d'entraînement entre les études.

Dans ces études, l'amélioration du statut enzymatique antioxydant est responsable d'une meilleure récupération fonctionnelle myocardique post-ischémique et/ou d'une réduction de la taille de la ZI chez les rats entraînés par rapport à leurs homologues sédentaires. En effet, en induisant un phénotype limitant le stress oxydant de reperfusion, l'exercice permet de protéger les protéines sensibles aux stress oxydant, dont notamment les protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique (French *et al.*, 2006), et de préserver l'intégrité cellulaire (Powers *et al.*, 1998).

D'autre part, de nombreuses études ont observé une augmentation des Hsp, dont principalement la Hsp72, dans la cardioprotection par l'exercice (Hamilton *et al.*, 2003 ; Demirel *et al.*, 2001). Cette protéine chaperone dont l'expression est augmentée en situation de stress, et notamment au cours de l'ischémie, a été rapportée comme pouvant induire une cardioprotection contre l'IR (Latchman, 2001), et ce notamment *via* son rôle stimulant sur l'activité de la MnSOD au cours de l'IR (Suzuki *et al.*, 2002). Néanmoins, elle a été démontrée comme étant un élément associé à la cardioprotection par l'exercice, mais non requis pour que se manifestent les effets bénéfiques de l'exercice sur la sensibilité du

myocarde à l'IR (Hamilton *et al.*, 2001 ; Quindry *et al.*, 2007). En effet, dans ces études, lorsque les rats sont entraînés en environnement froid (8°C), condition dans laquelle aucune augmentation de Hsp72 n'est observée, les effets cardioprotecteurs de l'exercice sur la sensibilité du myocarde à l'IR sont identiques à ceux du groupe de rats entraînés en environnement tempéré (22°C) présentant une augmentation d'expression de Hsp72.

2.3. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle de l'homéostasie calcique

Les travaux de French *et al.* (2006 ; 2008) ont montré qu'un exercice en endurance, mené préalablement à l'IR, permet de prévenir la dégradation des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (SERCA-2a, PLB, NCX, L-type Ca²⁺) et ainsi de limiter i) l'altération fonctionnelle myocardique (French *et al.*, 2006) et ii) la nécrose et l'apoptose cellulaire (French *et al.*, 2008). Cette cardioprotection par l'exercice est attribuée à une meilleure activité antioxydante de la MnSOD associée à une moindre activation des calpines. D'autre part, de manière intéressante, Lu *et al.* (2002), ainsi que Medeiros *et al.* (2008) ont mis en évidence sur des modèles différents, qu'un exercice en endurance permet respectivement de limiter ou de décaler l'installation d'une dysfonction cardiaque provoquée par une hyperactivité sympathique chronique, et ce par normalisation ou prévention de l'altération des protéines régulatrices des mouvements calciques intracellulaires.

Ces effets bénéfiques de l'exercice ont également été remarquablement rapportés dans les phénomènes de remodelage cardiaque post-infarctus. Ainsi dans une étude très complète, allant d'une évaluation du remodelage cardiaque par échocardiographie à une analyse de la contractilité de cardiomyocytes isolés, Wisloff *et al.* (2002) ont mis en évidence une normalisation des mouvements calciques, associée à une restauration de la fonction contractile myocardique, avec une prévention secondaire par l'exercice chez des rats insuffisants cardiaques. Ces résultats sont expliqués par une meilleure régulation des flux calciques intracellulaires *via* une normalisation de l'expression de NCX et SERCA-2a, ainsi

qu'une meilleure sensibilité des myofilaments au Ca^{2+} . Il est toutefois à noter que cette prévention secondaire par l'exercice était de durée et d'intensité relativement élevées (5 séances/semaine pendant 8 semaines, à raison de 1h30 d'exercices intermittents/séance) bien qu'elle ait débuté 4 semaines après l'infarctus du myocarde. Plus récemment, les travaux de Aït Mou *et al.* (2009) ont montré des effets comparables de l'exercice sur l'amélioration du remodelage cardiaque post-infarctus avec un modèle d'exercice chronique en endurance d'intensité modérée débuté lors de la phase tardive du remodelage (13 semaines post-infarctus). A l'inverse, de Waard *et al.* (2007) ont évalué chez la souris les effets d'une pratique d'exercice volontaire de 8 semaines débutée seulement 24 heures après l'induction de l'infarctus. Dans cette étude, l'exercice était responsable d'une amélioration du raccourcissement sarcomérique liée à une normalisation de la fonction des myofilaments, mais sans modifications des mouvements calciques et des protéines régulatrices impliquées (SERCA-2a, PLB).

2.4. Effets cardioprotecteurs de l'exercice : rôle de la eNOS myocardique

La synthèse de NO par la eNOS semble jouer un rôle essentiel dans la prévention du remodelage cardiaque post-infarctus (Jones *et al.*, 2003). de Waard *et al.* (2009) se sont alors intéressés au rôle que pouvait jouer la eNOS dans les effets bénéfiques de l'exercice sur la fonction contractile post-infarctus, qu'ils avaient préalablement montré (*cf* paragraphe précédent) (de Waard *et al.*, 2007). De manière intéressante, ces auteurs ont mis en évidence le rôle essentiel du maintien de l'état couplé de la eNOS dans les effets bénéfiques de l'exercice sur le remodelage myocardique post-infarctus. En effet, ces auteurs ont induit de manière transgénique une surexpression de eNOS chez des souris entraînées afin de tenter de potentialiser les effets bénéfiques de l'exercice. De manière inattendue, alors que l'exercice ou l'augmentation d'expression de la eNOS, permettent l'un et l'autre, indépendamment, d'améliorer le remodelage post-infarctus, la combinaison des deux est à

l'origine d'effets délétères. Puisqu'un traitement antioxydant ou une supplémentation en BH₄+L-arginine préviennent la perte des effets bénéfiques de l'exercice chez les souris surexprimant la eNOS, les auteurs expliquent ce résultat par une exacerbation du stress oxydant lié à un découplage de la eNOS myocardique. Toutefois en 2010, cette équipe démontra le rôle essentiel des capacités d'augmentation d'expression de la eNOS myocardique dans l'amélioration par l'exercice du remodelage post-infarctus. En effet, alors que les effets de l'exercice sont présents sur des souris eNOS^{+/+} ils sont totalement absents chez des modèles de souris eNOS^{-/-} mais également eNOS^{+/-}, dont la capacité de surexpression de eNOS en réponse à l'exercice est abolie (de Waard *et al.*, 2010).

Par ailleurs, de manière surprenante, malgré la mise en évidence du rôle de la eNOS dans la modulation de la sévérité des lésions d'IR myocardiques et malgré la reconnaissance de cette enzyme comme cible clef des adaptations à l'exercice, jusque très récemment (Calvert *et al.*, 2011) aucune étude ne s'était intéressée à l'implication de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice. Il est à noter qu'en 2007 Akita *et al.* (2007) avaient évoqué l'implication de la eNOS dans la cardioprotection avec un préconditionnement par l'exercice, chez des souris entraînées pendant les 7 jours précédents la chirurgie. En effet, les auteurs rapportent que la moindre sensibilité du myocarde à l'IR dans ce modèle est associée à la fois à une surexpression de iNOS et de eNOS.

En 2011 dans une étude novatrice, Calvert *et al.* (2011) ont été les premiers, et à notre connaissance les seuls à ce jour, à avoir démontré l'implication de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés au rôle de la eNOS et de son activation catécholaminergique, dépendante des récepteurs β₃-AR, dans la cardioprotection induite par la pratique régulière d'exercice. Ils ont ainsi démontré que la diminution de la sensibilité du myocarde à l'IR (réduction de la taille de la ZI) par l'exercice implique une augmentation des stocks de métabolites du NO (nitrites et nitrosothiols) dépendante d'une augmentation du niveau de eNOS-P^{ser1177} par la voie β₃-AR.

2.5. Autres facteurs

Parallèlement à l'implication majeure des éléments cités ci-dessus dans la cardioprotection par l'exercice, d'autres pistes sont également évoquées et restent à investiguer.

2.5.1. Les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K_{ATP} channels)

Le rôle des canaux K_{ATP} a été évoqué dans la cardioprotection par l'exercice, mais reste peu documenté. Ainsi Brown *et al.* (2005) ont mis en avant une perte de l'effet protecteur de l'exercice sur la taille de ZI lorsque les canaux K_{ATP} du sarcolemme étaient inhibés, tandis qu'aucun effet n'était constaté avec l'inhibition des canaux K_{ATP} mitochondriaux. A l'inverse, Quindry *et al.* (2010) ont rapporté l'implication de ces derniers dans l'effet anti-arythmique de l'exercice au cours de la reperfusion post-ischémique, sans effets des canaux situés sur le sarcolemme.

2.5.2. La mitochondrie

Des études récentes ont montré que l'exercice permettait i) de limiter les altérations fonctionnelles de l'organite au cours d'un phénomène *in vitro* d'anoxie-réoxygénation (Ascensão *et al.*, 2006) et ii) d'induire un phénotype mitochondrial plus résistant aux stimuli pro-apoptotiques rencontrés au cours de l'IR (Kavazis *et al.*, 2008).

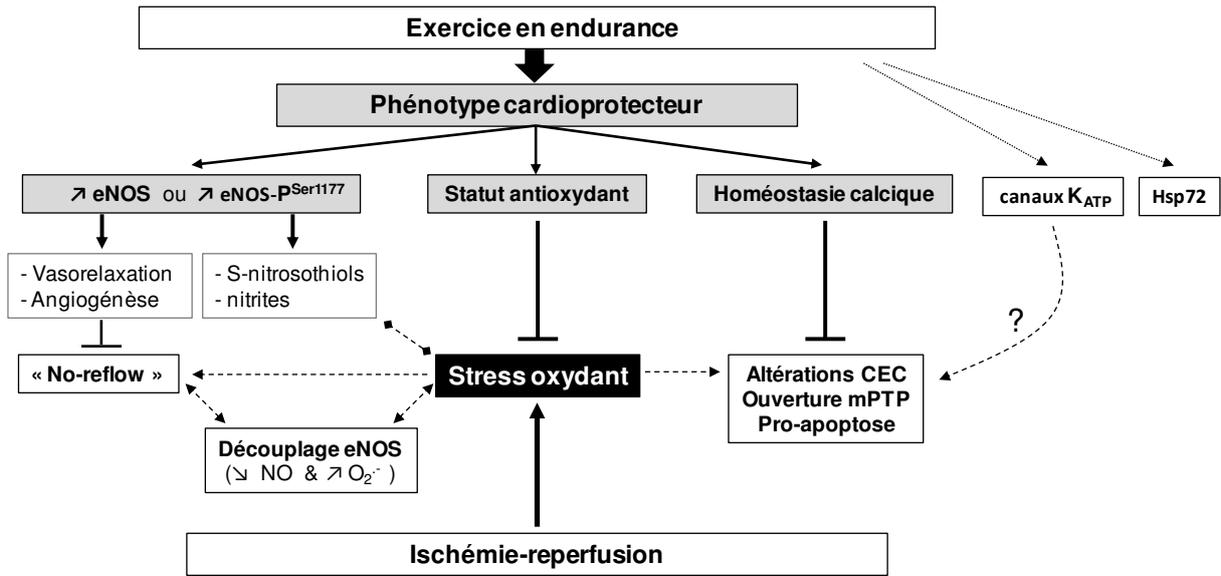


Figure I.13 : Effets cardioprotecteurs de l'exercice.

Objectifs

du travail de thèse

La revue de la littérature a permis de mettre en évidence l'efficacité de la pratique régulière d'exercices en tant que stratégie de cardioprotection, tant dans la prévention primaire d'un accident ischémique (Ascensão *et al.*, 2007; Powers *et al.* 2008), que dans la prévention secondaire du remodelage fonctionnel et morphologique post-infarctus (de Waard *et al.*, 2007; Wisloff *et al.*, 2002 ; Ait Mou *et al.*, 2009). Bien que les mécanismes impliqués dans la cardioprotection par l'exercice ne soient que partiellement connus, les améliorations du statut antioxydant myocardique (Powers *et al.*, 1998 ; Hamilton *et al.*, 2003 ; French *et al.*, 2006) ainsi que du CEC (Wisloff *et al.* 2002 ; French *et al.*, 2006 ; 2008 ; Ait Mou *et al.*, 2009) sont largement rapportées.

Par ailleurs, lors de mon arrivée en thèse, des études réalisées au laboratoire par Meyer *et al.*, dans la cadre d'un projet financé par l'Agence National de la Recherche, avaient permis de mettre en évidence qu'une exposition chronique au CO comparable à celle rencontrée en milieu urbain était associée à une aggravation de la sensibilité du myocarde à l'IR (Meyer *et al.*, 2010). En effet, une telle exposition a été montrée comme responsable de l'apparition d'un phénotype pathologique caractérisé par une altération de l'homéostasie calcique et du statut redox cellulaire (André *et al.*, 2010), à l'origine d'une plus grande vulnérabilité du cœur à un stress d'IR (Meyer *et al.*, 2010). Etant donné les effets bénéfiques reconnus de l'exercice sur ces paramètres cellulaires, en continuité de ce projet de recherche, nous nous sommes alors interrogés sur les effets potentiellement cardioprotecteurs d'une pratique régulière d'exercice sur le développement d'un tel phénotype pathologique et sur ses conséquences sur la vulnérabilité du cœur à l'IR.

Objectif n°1 :

Ainsi, le premier objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer comment la pratique régulière d'une activité physique à intensité modérée permettait de prévenir le développement d'un phénotype sensible à l'IR (**étude n°1**).

Dans un second temps, après s'être intéressés aux effets préventifs de l'exercice sur le développement d'un phénotype plus vulnérable aux lésions d'IR, nous nous sommes ensuite focalisés sur les mécanismes intrinsèques associés à la cardioprotection par l'exercice, chez un modèle de rats sains soumis à une IR myocardique.

La revue de littérature a permis de mettre en évidence le rôle majeur de la eNOS dans la modulation de la sensibilité du myocarde à l'IR. Par ailleurs, bien que cette enzyme soit reconnue comme une cible privilégiée des adaptations à l'exercice, à ce jour seule une étude a démontré qu'elle pouvait jouer un rôle majeur dans la cardioprotection par l'exercice, et ce *via* son activation par phosphorylation (Calvert *et al.*, 2011). Toutefois son rôle au cours des phases d'ischémie et de reperfusion reste non investigué.

Objectif n°2 :

Ainsi, le second objectif de ce travail de thèse était i) de confirmer ou non le rôle de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice et ii) d'évaluer comment l'exercice peut influencer sur les modulations fonctionnelles de cette enzyme au cours de l'IR (**étude n°2**).

Le découplage de la eNOS a clairement été rapporté comme jouant un rôle majeur dans la sévérité des lésions de reperfusion (Carnicer *et al.*, 2012), et de ce fait le maintien de l'état dimérisé de l'enzyme est couramment associé à une réduction de la sensibilité du myocarde à l'IR (Verma *et al.*, 2002; Tienfenbacher *et al.*, 2003 ; Moens & Kass 2006). Au regard de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la cardioprotection induite par l'exercice pouvait être liée à un meilleur maintien de l'état couplé de la eNOS au cours de la reperfusion. Néanmoins, de manière inattendue, nous avons observé dans ce travail que la cardioprotection induite par la pratique régulière d'un exercice était associée à une exacerbation du découplage de la eNOS myocardique au cours des premières minutes de reperfusion.

Objectif n°3 :

Ainsi, le troisième objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer le rôle de ce découplage de la eNOS au cours de l'IR dans la cardioprotection induite par l'exercice (**étude n°3**).

Dans les études précédentes, nous avons ainsi mis en évidence le rôle de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice. Calvert *et al.* (2011) ont préalablement rapporté que l'activation de la eNOS au cours des séances d'exercice, permettant finalement d'aboutir à un phénotype moins sensible à l'IR, impliquait la stimulation catécholaminergique des récepteurs β_3 -AR. Dans cette dernière étude, nous avons donc voulu évaluer l'impact de cette phosphorylation catécholaminergique-dépendante de la eNOS, indépendamment de tout les effets connus de l'exercice, notamment sur le statut antioxydant et l'homéostasie calcique. Pour cela, nous avons stimulé de manière pharmacologique l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177}, par une injection intraveineuse d'épinéphrine.

Objectif n°4 :

Ainsi, le dernier objectif de ce travail de thèse a été i) d'évaluer l'impact de la phosphorylation de la eNOS dépendante des catécholamines dans la cardioprotection, et ii) afin de mieux comprendre comment l'augmentation catécholaminergique de eNOS-P^{Ser1177} participe à la modulation de l'état d'activation de la eNOS au cours de l'IR, d'évaluer l'impact de cette stratégie pharmacologique sur la phosphorylation et le couplage de la eNOS au cours la reperfusion post-ischémique (**étude n°4**).

Matériels et méthodes

Préambule

L'ensemble de ce travail a essentiellement été réalisé au sein du laboratoire EA 4278, Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire. Les expérimentations sur cardiomyocytes isolés ont été conduites, dans le cadre d'une bourse de mobilité financée par le Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, au sein du laboratoire INSERM U-1046 Physiologie & Médecine Expérimentale Cœur et Muscles, équipe 2 (Montpellier, dirigé par le Pr Jacques Mercier ; équipe dirigée par le DR Alain Lacampagne).

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les directives du ministère français de l'agriculture et les conventions européennes d'utilisation et de conditionnement des animaux de laboratoire (Comité régional d'éthique, n°: 84.004 ; agrément de l'animalerie EA4278 : A84-007-2).

Ce travail est organisé en 4 études indépendantes dont les spécificités des procédures expérimentales seront précisées et exposées distinctement.

I. POPULATIONS

L'ensemble des expériences a été réalisé sur des rats mâles Wistar (Charles River Laboratory) âgés de 12 à 14 semaines (382 ± 38 g). Les animaux ont été hébergés dans une animalerie homologuée (Animalerie de l'EA 4278, UFR Sciences Avignon) dans des conditions standards de température et d'humidité, et exposés à un rythme circadien de 12 heures de jour / 12 heures de nuit.

1. Etude n°1

Dans cette première étude nous nous sommes intéressés aux effets potentiellement protecteurs de l'exercice en endurance sur les effets délétères d'une exposition prolongée au CO, notamment à l'origine d'une sensibilité accrue du myocarde à l'IR. Pour cela les rats ont été répartis aléatoirement en 3 groupes: rats sédentaires, exposés (**CO-Sed**) ou non (**Ctrl-Sed**) à un environnement pollué au CO, et rats entraînés exposés au CO (**CO-Ex**) (Fig. II.2).

1.1. Exposition au CO

Différentes enquêtes portant sur la qualité de l'air ont rapporté que les concentrations de CO rencontrées en milieu citadin étaient comprises entre 2 à 40 particules par million (ppm) mais pouvaient atteindre des pics journaliers de 170 ppm (Wright *et al.*, 1975 ; Stern *et al.*, 1988 ; Finkelstein *et al.*, 2005). Afin de simuler une pollution urbaine au CO, les animaux ont été placés pendant 12 heures dans un caisson hermétique, relié à une source de CO. Les émissions de CO étaient régularisées par un système d'électrovanne piloté par un système informatique relié à un analyseur de CO (CO CHEMGARD Infrared Gas Monitor NEMA 4 Version (MSA)), permettant ainsi un contrôle des concentrations de CO à l'intérieur du caisson. Ainsi, les rats étaient exposés à une concentration résiduelle de CO de 30 ppm

entrecoupée de 5 pics d'1 heure à 100 ppm. Suite aux 12 heures d'exposition, les animaux étaient replacés en environnement standard d'animalerie (air filtré, CO <1 ppm). L'exposition au CO a été réalisée quotidiennement pendant 4 semaines (Fig. II.1).

Afin d'éviter tout effet aigu du CO lors des expérimentations, les animaux étaient maintenus pendant 24 heures en environnement standard d'animalerie avant d'être sacrifiés.

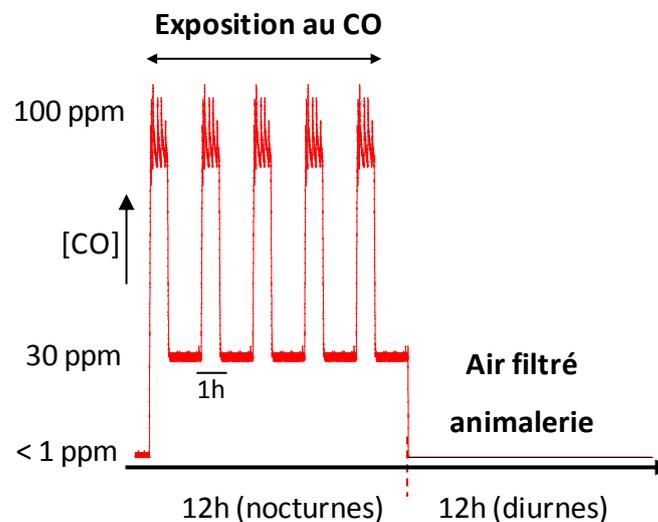


Figure II.1: Schématisation du protocole journalier d'exposition au monoxyde de carbone (CO).
ppm : particules par million.

1.2. Protocole d'entraînement

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets potentiellement protecteur d'une activité physique régulière modérée, telle que recommandée par l'OMS, sur le remodelage cellulaire délétère et la sensibilité accrue du myocarde à l'IR rapportée après une exposition de type environnementale urbaine au CO (Andre *et al.*, 2010 ; Meyer *et al.*, 2010). En effet l'OMS préconise de pratiquer un exercice physique de 30 minutes à intensité modérée, au moins 5 jours par semaine. Ainsi, dans cette étude les rats ont été soumis à un protocole d'entraînement pendant les 4 semaines précédant l'exposition au CO, à raison de 5 séances

consécutives par semaine de 40 minutes chacune, réalisées sur tapis roulant motorisé. Les séances d'entraînement étaient pratiquées en environnement standard d'animalerie.

Durant la première semaine, les animaux étaient familiarisés au tapis roulant avec une première séance de 15 minutes à une vitesse de 17m/min. Chaque jour, une augmentation du temps de course de 5 minutes était réalisée afin d'atteindre 35 minutes de course en fin de semaine. Les semaines suivantes, chaque séance comptait 35 minutes de course à 17m/min, puis 18m/min la troisième semaine, et 20m/min la dernière semaine. Durant toute la durée du protocole, chaque séance débutait par un échauffement de 5 minutes à 10m/min, avec une augmentation progressive de la vitesse jusqu'à atteindre celle requise pour l'entraînement. L'intensité d'effort était ainsi estimée tout au long du protocole à environ 50% de la vitesse maximale aérobie (VMA) des animaux.

Après cette période d'entraînement, lors des 4 semaines suivantes correspondant à la phase d'exposition ou non au CO, les rats exercés maintenaient un entraînement identique à celui réalisé en dernière semaine du protocole d'entraînement, mais à raison de 2 séances par semaine uniquement (Fig. II.2).

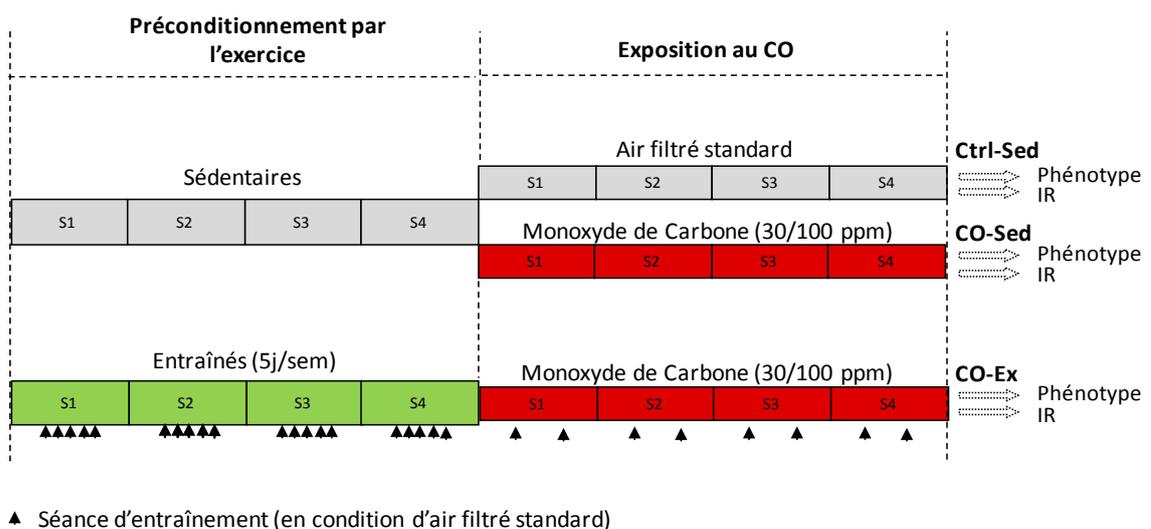


Figure II.2: Organisation du protocole d'entraînement et d'exposition au CO.

2. Etudes n°2 et n°3

Dans ces 2 études, nous nous sommes intéressés au rôle de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice. Pour cela les rats ont été répartis aléatoirement en 2 groupes : sédentaires (**Sed**) ou entraînés (**Ex**).

2.1. Protocole d'entraînement

Dans ces 2 études, les rats ont suivi un protocole d'entraînement de 5 semaines réalisées sur tapis roulant motorisé, à raison de 5 séances consécutives par semaine de 45 minutes chacune à une intensité d'environ 70% de VMA (25m/min). Comme pour l'étude n°1, durant la première semaine les rats ont été familiarisés au tapis par une augmentation progressive de l'intensité et de la durée des séances. Durant les 4 semaines suivantes, la durée et l'intensité de l'effort ont été appliquées telles que présentées ci-dessus.

Afin d'éviter tout effet aigu de l'exercice lors des expérimentations, les rats ont été sacrifiés après 24 heures de repos.

3. Etude n°4

Dans cette dernière étude nous nous sommes intéressés au rôle de la phosphorylation catécholaminergique de la eNOS sur son résidu Ser¹¹⁷⁷, indépendamment des effets de l'exercice. Les rats ont alors été répartis aléatoirement en 2 groupes : un groupe de rats recevant une simple injection d'épinéphrine (**EPI**) et un groupe recevant une injection de NaCl (0.9%, *i.v.*) (**Ctrl**).

II. ISCHEMIE-REPERFUSION SUR CŒUR ISOLÉ

1. Cœur isolé-perfusé de Langendorff et pharmacologie

Suite aux différentes conditions expérimentales (exposition au CO avec ou sans entraînement préalable pour l'étude 1 ; entraînement pour les études 2 et 3 ; injection d'EPI pour l'étude 4), les rats étaient anesthésiés avec du pentobarbital sodique (100 mg/kg, *i.p*) et recevaient une injection d'héparine (1000 UI/kg, *i.v.*) afin d'éviter la formation de caillot sanguin au moment du prélèvement de l'organe. Une thoracotomie était réalisée et le cœur était rapidement prélevé puis immergé dans une solution froide (4°C) de Krebs-Henseleit (NaCl: 118.3 mM; KCl: 4.7 mM; MgSO₄: 1.2mM; KH₂PO₄: 1.2 mM; NaHCO₃: 25 mM; Glucose: 11 mM; CaCl₂: 2.5 mM) afin de stopper les contractions spontanées cardiaques. Une fois nettoyé, le cœur était canulé par l'aorte sur un poste de cœur isolé-perfusé de Langendorff et perfusé de manière rétrograde à une pression constante de 80 mmHg.

Une fois l'organe perfusé, les oreillettes étaient excisées et le nœud sinusal était délicatement lésé par compression afin de s'affranchir de la dépolarisation autonome du cœur. Un ballonnet en latex, relié à un capteur de pressions (TSD104A, BioPac System Inc) était introduit dans le ventricule gauche (VG). Le cœur était ensuite stimulé électriquement (SS58L, BioPac System Inc) à 300 battements par minute et le volume du ballonnet était ajusté afin de régler la pression télédiastolique basale à 5 mmHg.

Une fois cette procédure réalisée, le cœur était alors maintenu stable pendant 20 minutes dans ces conditions puis était soumis à un protocole d'IR myocardique tel que décrit spécifiquement ci-dessous pour chaque étude.

1.1. Etude n°1

Dans cette première étude un modèle d'IR régionale a été utilisé. Après une stabilisation de 20 minutes, une ligature de l'artère coronaire antérieure gauche (ACG) était pratiquée en plaçant un fil de suture (fil de soie 6-0) autour du vaisseau, noué sur une petite tubulure en plastique placée à la surface du cœur afin de comprimer l'artère. L'ischémie régionale était alors maintenue 30 minutes. Pour reperfusion la zone ischémisée, la tubulure était délicatement enlever afin de permettre la reperfusion de l'organe. Au bout de 2 heures de reperfusion la ligature de l'ACG était à nouveau réalisée et une solution de bleu d'Evans (5ml, 2%) était injectée dans le perfusat afin de distinguer la zone ischémisée (zone à risque) de la zone saine (colorée en bleu). Le cœur était ensuite rapidement congelé pour déterminer ultérieurement la mort cellulaire.

1.2. Etudes n°2 et n°3

Pour ces 2 études, après 20 minutes de stabilisation, une ischémie totale et globale était pratiquée pendant 30 minutes en interrompant totalement la perfusion cardiaque. Afin de maintenir le cœur à 37°C, la chambre thermostatée placée autour de l'organe était remplie de Krebs-Henseleit chauffé durant toute la durée de l'ischémie. Au cours de cette période ischémique la stimulation électrique cardiaque était interrompue. Le cœur était ensuite reperfusé pendant 2 heures puis rapidement prélevé et congelé afin d'évaluer *a posteriori* la mort cellulaire.

De plus, dans l'étude n°2, afin d'évaluer l'implication de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice, une perfusion de L-NAME (100 µM) était administrée pendant les 5 dernières minutes de stabilisation et lors des 5 premières minutes de reperfusion (2 ml perfusés à 0.4 ml/min) (groupes **Sed+L-NAME** et **Ex+L-NAME**) (Fig. II.3).

Dans l'étude n°3, afin d'évaluer le rôle du couplage de la eNOS sur la sensibilité du cœur à l'IR, une solution de BH₄ (50 µM), le cofacteur essentiel à l'état couplé de l'enzyme, était perfusée uniquement pendant les 5 premières minutes de reperfusion (groupes **Sed+BH₄** ; **Ex+BH₄** reperf), ou au cours des 5 minutes avant et après l'ischémie myocardique (groupes **Sed+BH₄** ; **Ex+BH₄**) (2 ml perfusés à 0.4 ml/min) (Fig. II.3).

Enfin, pour la réalisation de dosages biochimiques, des cœurs étaient congelés directement après l'ischémie ou à 10 minutes de reperfusion (description détaillée de ces protocoles dans la partie IV).

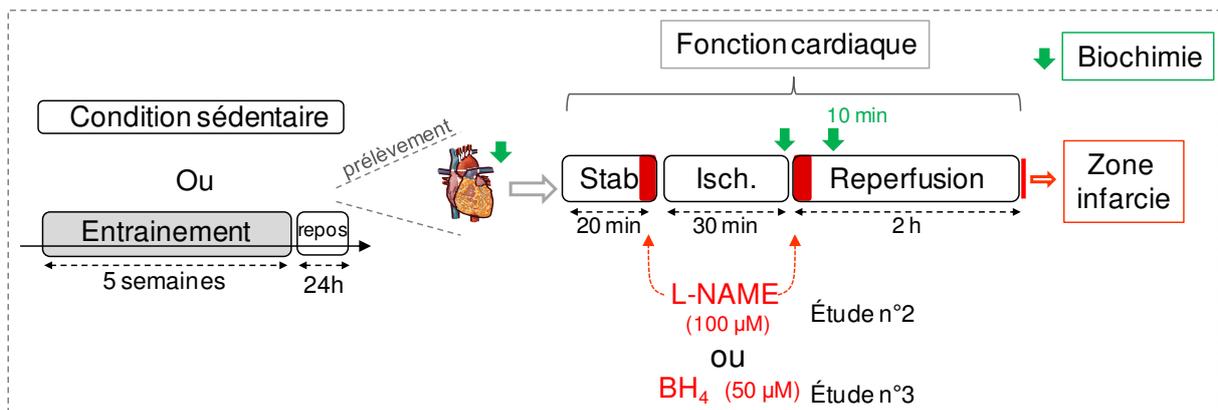


Figure II.3: Représentation des protocoles expérimentaux des études n°2, n°3.

1.3. Etude n°4

Dans cette dernière étude, afin d'évaluer le rôle de la phosphorylation catécholaminergique de la eNOS au niveau de son résidu Ser¹¹⁷⁷ sur la sensibilité du myocarde à l'IR, une administration d'épinéphrine (EPI) a été pratiquée sur des rats sédentaires. Pour cela, les rats ont été anesthésiés au pentobarbital sodique (100 mg/kg, *i.p.*), puis une trachéotomie a été pratiquée afin de ventiler artificiellement les animaux. Une injection d'EPI (10 µg/kg, *i.v.*) au niveau de la veine saphène a été réalisée afin d'induire une

phosphorylation de la eNOS sur son résidu Ser¹¹⁷⁷ (Calvert *et al.*, 2011). Après cette injection d'EPI, les animaux étaient maintenus vivants pendant 30 minutes au cours desquelles ils étaient maintenus au chaud sur tapis thermostaté (37°C) et un enregistrement continu de l'électrocardiogramme était réalisé afin de s'assurer de leur viabilité. A la fin de cette période, une injection d'héparine (1000 UI/kg, *i.v.*) était réalisée, puis le cœur était prélevé et monté sur un poste de cœur isolé-perfusé de Langendorff, comme précédemment exposé.

Un premier lot de cœurs était uniquement soumis à 10 minutes de stabilisation puis le cœur était récupéré et congelé dans l'azote liquide, après excision du ventricule droit (VD), afin de pouvoir ultérieurement évaluer le niveau de eNOS-P^{Ser1177}.

Un second lot de cœurs était soumis à 20 minutes de stabilisation puis à une ischémie totale globale, telle que décrite précédemment, suivie de 10 minutes de reperfusion. Le cœur était récupéré et congelé dans l'azote liquide après excision du VD, afin de réaliser les dosages biochimiques (Fig. II.4).

Enfin, sur un dernier lot de rats ayant reçu l'injection d'EPI, un protocole d'IR tel que réalisé pour les études n° 2 et n°3 a été pratiqué afin d'évaluer la taille de la ZI (Fig. II.4).

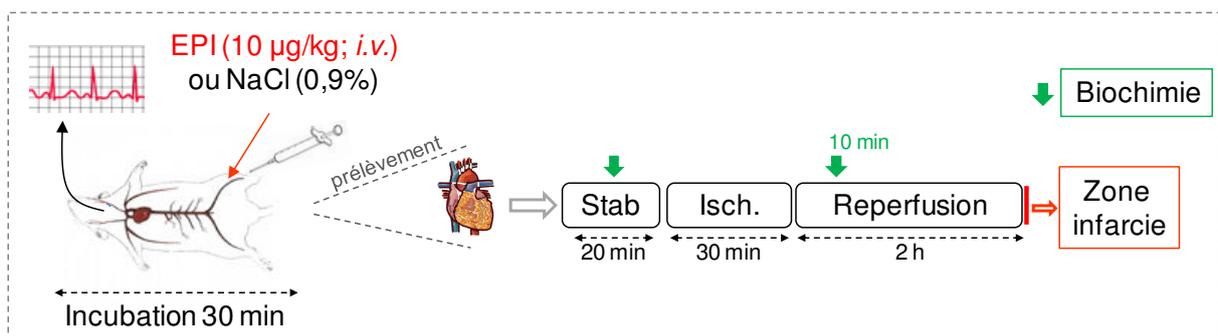


Figure II.4: Représentation du protocole expérimental de l'étude n°4.

2. Evaluation des paramètres fonctionnels au cours de l'IR

Durant tout le protocole d'IR, la pression intra-ventriculaire a été enregistrée en continue (MP35, BioPac System Inc). A partir de ces données, la pression systolique (P_{syst} ; mmHg), la pression diastolique (P_{diast} ; mmHg), la pression développée (P_{dev} ; mmHg ; définie comme la différence entre P_{syst} et P_{diast}), ainsi que les dérivées maximale (dP/dt_{max} ; mmHg/s) et minimale (dP/dt_{min} ; mmHg/s) de pression ont été analysées (Fig. II.5). De plus, le recueil des effluents coronaires a été réalisé en continu au cours de l'expérimentation afin d'évaluer les variations de débit coronaire (ml/min).

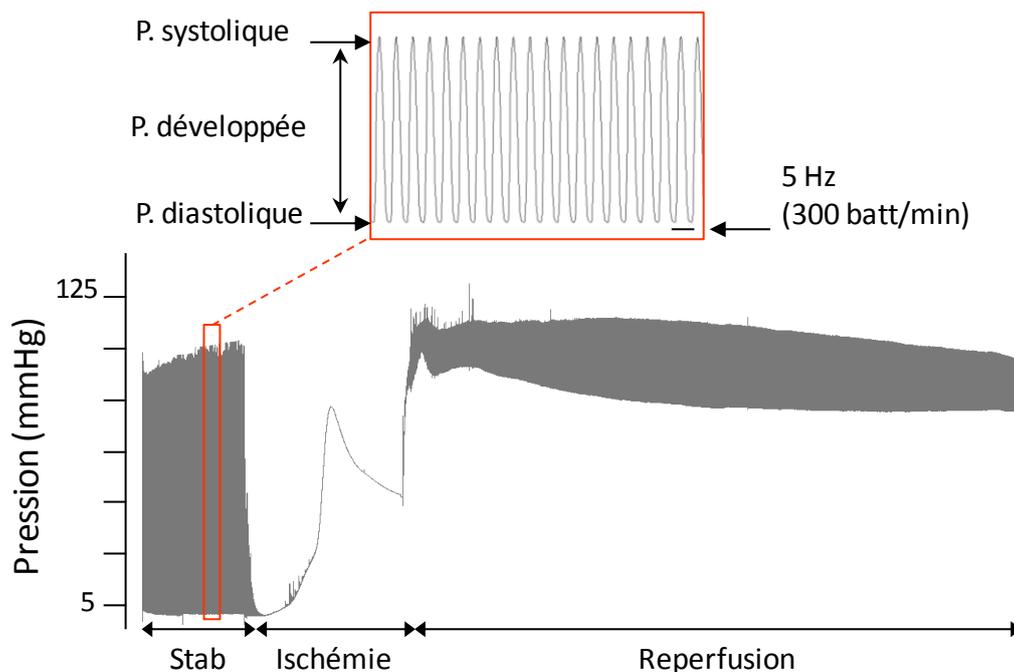


Figure II.5: Exemple d'un tracé de pression obtenu au cours d'un protocole d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé perfusé de Langendorff.

3. Evaluation de taille d'infarctus

L'évaluation de la taille de la zone infarctée a été réalisée selon une méthode de coloration au triphenyl-tetrazolium chloride (TTC) décrite Fishbein *et al.* (1981). A la fin des 2 heures de reperfusion, après avoir été congelés (-20°C), les cœurs étaient découpés en fines tranches (\approx 2 mm) (perpendiculairement à l'axe base-apex) mises à incuber pendant 25 minutes à 37°C dans une solution de TTC (0.5 mg/ml). Le marquage au TTC est basé sur la capacité des enzymes déshydrogénases de la chaîne respiratoire des mitochondries en activité, et donc vivantes, à réduire le TTC en formazan de couleur rouge. Ainsi l'incubation dans le TTC permet de faire apparaître la distinction entre les zones tissulaires vivantes (colorées en rouge) et les zones nécrosées (non colorée, de couleur blanchâtre). L'évaluation de la zone saine et de la ZI de chaque coupe de cœur, préalablement photographiée, était ensuite effectuée par planimétrie (logiciel ImageJ).

Pour l'étude n°1, la coloration au bleu d'Evans a permis de distinguer la zone non-ischémisée (ou zone saine ; colorée en bleu) de la zone ischémisée (ou zone à risque ; non colorée en bleu) au sein de laquelle se trouve la ZI (Fig. II.6). La taille de la ZI a été exprimée en pourcentage de la taille de la zone à risque. L'évaluation de la taille de la zone à risque a été exprimée en fonction de la taille totale du VG, ce qui a permis de s'assurer de la reproductibilité de la ligature de l'ACG. Les cœurs ayant subi une fibrillation ventriculaire (FV) irréversible ont été exclus de cette analyse.

Pour les études n°2, 3 et 4, dont les ischémies réalisées étaient globales, la taille de la ZI a été exprimée en fonction de la taille du VG (Fig. II.6).

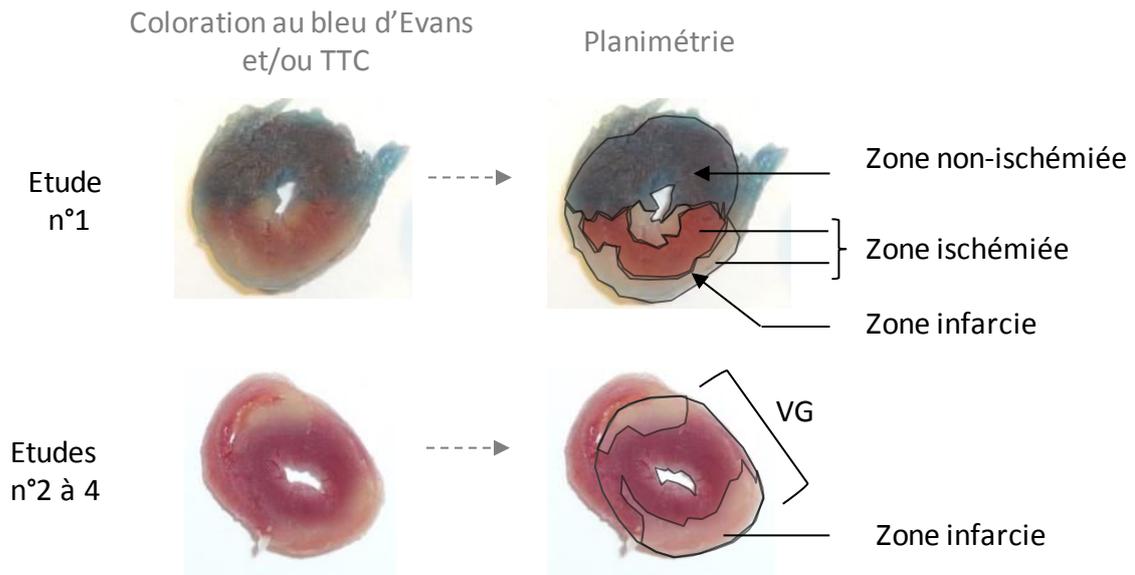


Figure II.6: Evaluation de taille de la zone infarctée par colorimétrie et planimétrie. TTC : triphenyl-tetrazolium chloride ; VG : ventricule gauche.

4. Evaluation des arythmies de reperfusion (étude n°1)

L'étude des arythmies de reperfusion a été réalisée au cours des 5 premières minutes de reperfusion myocardique. Les types d'arythmies évalués sont définis en accord avec les conventions de Lambeth (Walker *et al.*, 1988), selon un modèle adapté aux rongeurs permettant leur étude à partir du tracé des pressions (Huggins *et al.*, 2008). Les arythmies de reperfusion évaluées sont les FV (définies comme une période durant laquelle la Pdev est inférieure à 10 mmHg, et ce sur une durée supérieure à 5 secondes) réversibles et irréversibles (Fig. II.7). Afin de déterminer la sévérité des arythmies de reperfusion, l'incidence de ces deux types de FV a été quantifiée en mesurant le nombre de cœurs par groupe expérimental ayant développé l'une et/ou l'autre de ces arythmies. Le résultat a été exprimé en pourcentage du nombre total de cœurs par groupe.

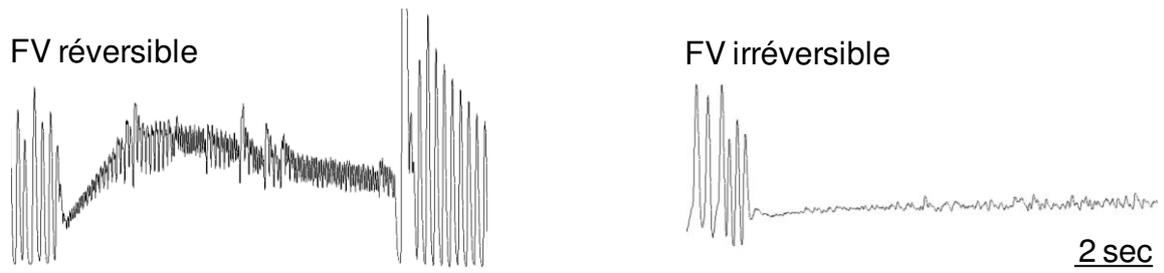


Figure II.7: Représentation des arythmies de reperfusion évaluées dans l'étude n°1. FV : fibrillation ventriculaire.

III. ETUDE DU COUPLAGE EXCITATION- CONTRACTION SUR CARDIOMYOCYTES ISOLÉS

1. Isolement des cardiomyocytes

Le protocole d'isolement cellulaire a été réalisé tel que décrit par André *et al.* (André *et al.*, 2010). Les rats ont été anesthésiés et le cœur a été prélevé selon la procédure précédemment décrite pour l'IR. Après avoir été rapidement nettoyé, le cœur était monté sur un système de perfusion rétrograde de Langendorff chargé en solution Hanks-HEPES dépourvue de Ca^{2+} (NaCl : 117 mM ; KCl : 5.7 mM ; NaHCO_3 : 4.4 mM ; KH_2PO_4 : 1.5 mM ; MgCl_2 : 1.7 mM ; Hépes : 21 mM ; Taurine : 20 mM ; Glucose : 11.7 mM ; pH = 7.5). Une brève stabilisation était réalisée afin de rincer le réseau coronaire et vider les cavités du sang résiduel, puis le cœur était ensuite perfusé pendant une durée de 15 à 20 minutes avec une solution enzymatique de dissociation contenant de la collagénase de type A (0.8 mg/ml), permettant de digérer la matrice extracellulaire. Une fois la digestion enzymatique terminée, le cœur était récupéré, les oreillettes découpées, et une digestion mécanique était réalisée dans une solution « zéro Ca^{2+} » à l'aide de ciseaux puis d'une pipette. La solution obtenue était filtrée (Nylon 250 Mesh) afin d'éliminer les tissus non-digérés, et placée à décanter à 37°C. La solution était à nouveau rincée avec une solution « zéro Ca^{2+} », puis une remontée de la concentration en calcium du milieu était progressivement effectuée afin d'atteindre une concentration finale de 1 mM de Ca^{2+} . Les cellules étaient alors maintenues au repos pendant 30 minutes à 37°C. Les solutions employées pour la remontée calcique et les procédures expérimentales ultérieures étaient composées de Hanks-HEPES tel que décrit précédemment, ajustées à différentes concentrations calciques.

2. Evaluation du raccourcissement cellulaire et imagerie calcique

2.1. Principe

Le système IonOptix (Boston, USA) permet d'étudier le couplage entre le raccourcissement des sarcomères et les mouvements calciques à l'aide d'une sonde fluorescente. La mesure de la longueur des sarcomères repose sur une propriété structurale intrinsèque des cardiomyocytes : l'alternance régulière des bandes claires (isotropes) et sombres (anisotropes) des protéines contractiles (actine et myosine). Cette alternance peut être assimilée à une fonction périodique de l'espace, analysée par une fonction mathématique : la transformée de Fourier rapide. Cette fonction permet de transformer un signal périodique pur (de périodicité T) en une raie de fréquence dont la valeur fondamentale est $1/T$. L'analyse fréquentielle des sarcomères par la transformée de Fourier rapide donne un spectre de fréquences dont la valeur fondamentale est inversement proportionnelle à la distance moyenne entre deux sarcomères. L'acquisition et l'analyse des variations de longueurs des sarcomères, réalisées à l'aide du logiciel IonOptix, s'effectuaient à l'intérieur d'une fenêtre d'acquisition dont la position était choisie de telle sorte que l'on puisse visualiser le maximum de sarcomères. L'analyse de l'image numérisée était effectuée toutes les 20 ms, durée inférieure à la durée moyenne de contraction des cellules cardiaques à température ambiante (22° C) qui est de plusieurs centaines de millisecondes. La résolution de la mesure de la longueur des sarcomères selon ce dispositif expérimental est de ± 7 nm. Par ailleurs, afin de mesurer les variations de $[Ca^{2+}]_i$, les cellules sont incubées dans un indicateur calcique ratiométrique fluorescent, l'Indo-1 AM. Ce dernier est un fluorochrome utilisé en simple excitation (UV 360) et double émission (480 et 405 nm). La forme libre de l'Indo-1 émet à une fluorescence à 480 nm alors que la forme liée au Ca^{2+} émet à 405 nm. Ainsi quand la concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmente, l'amplitude du pic à 480 nm diminue, alors que celle du pic à 405 nm augmente. Le rapport F_{405}/F_{480} reflète alors la

concentration de $[Ca^{2+}]_i$ dans une gamme de concentration de 5 nM à 30 μ M, en minimisant les artéfacts de mouvement.

2.2. Protocole

Pour réaliser les mesures de raccourcissement des cardiomyocytes et de flux calciques, après leur isolement les cellules étaient incubées pendant 30 minutes dans l'Indo-1AM (50000 cellules/ μ L d'Indo). Une fois chargée en Indo-1AM, les cellules étaient placées dans une cuve de solution physiologique de concentration en Ca^{2+} de 1.8 mM et stimulées électriquement à une fréquence de 1.0 Hz avec des électrodes de platine. La sonde était excitée par une lampe Xénon 75 W (XBO 75, 14 V) à 360 nm. Les signaux de fluorescence étaient collectés par deux photomultiplicateurs (PM1, PM2 Hamamatsu R1104). L'enregistrement du raccourcissement des cardiomyocytes, associé aux variations de mouvements calciques intracellulaires, était réalisé en temps réel sur une période de 30 secondes.

Les paramètres évalués à partir de ces enregistrements sont : i) la fraction de raccourcissement cellulaire (définie comme le pourcentage de variation de longueur des sarcomères lors de la stimulation), ii) l'amplitude du transitoire calcique, indicateur de la quantité de Ca^{2+} libérée à chaque stimulation (définie comme la différence entre le pic du transitoire et le niveau basal), iii) le Ca^{2+} basal, marqueur de la concentration diastolique de Ca^{2+} cytosolique, iv) la vitesse de décroissance du Ca^{2+} cytosolique (Tau, correspondant au temps nécessaire à la restauration de 50% du Ca^{2+} basal), reflet de la cinétique du repompage et de l'élimination du Ca^{2+} cytosolique (Fig. II.8). La mesure de ces variables et leur analyse ont été effectuées avec le logiciel IonOptix.

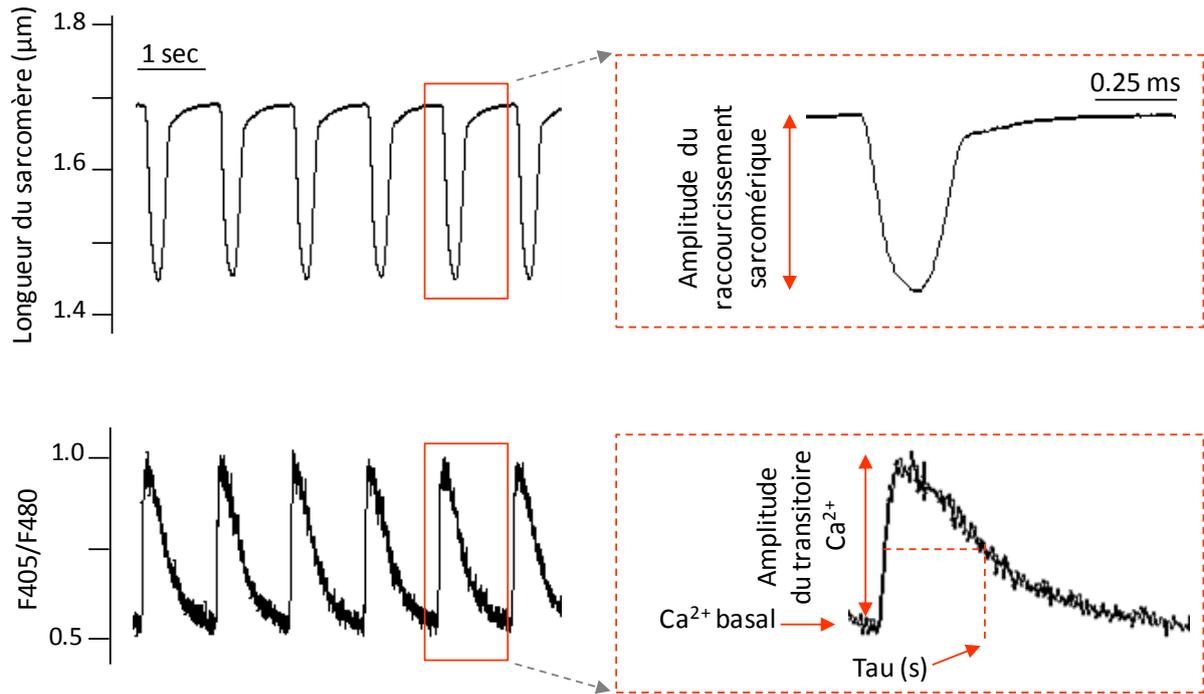


Figure II.8: Tracés types de variations de longueur des sarcomères et d'imagerie calcique sur cardiomyocyte isolé stimulé électriquement. Représentations des paramètres calculés.

IV. BIOCHIMIE

Afin d'évaluer les effets du CO, avec ou sans entraînement préalable (étude n°1), de l'exercice seul (étude n°1 et étude n°2), ou de l'administration de drogue (étude n°2), des dosages biochimiques ont été réalisées sur des lots de cœurs d'animaux sacrifiés après ces différentes conditions expérimentales (**Stab.**). Ensuite, pour les études n°2, n°3 et n°4, afin d'investiguer les effets de l'IR et des différentes stratégies de cardioprotection sur cette pathologie, des cœurs ont également été congelés dans l'azote liquide soit i) directement après la phase ischémique (**Isch.**), ou ii) après 10 minutes de reperfusion (**Reperf.**). Pour cela le cœur était récupéré, le VD excisé, puis le VG était placé dans de l'azote liquide et congelés à -80°C.

1. Capacité antioxydante myocardique

1.1. Capacité enzymatique antioxydante myocardique (étude n°1)

Les tissus ventriculaires prélevés étaient homogénéisés dans un tampon Tris-HCl (60 mM), contenant 1 mM d'acide diéthylènetriaminepenta-acétique (pH = 7.4 ; 10 ml/g w.wt), à l'aide d'un homogénéisateur téflon. Les tissus homogénéisés étaient ensuite centrifugés à 2000 g à 4°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. L'homogénat ainsi obtenu était utilisé pour évaluer les activités enzymatiques de la SOD, de la CAT et de la GPx. Les activités enzymatiques ont été exprimées en unité internationale par milligramme de protéine (UI/mg prot). Le dosage des protéines de l'homogénat était réalisé selon la méthode décrite par Lowry *et al.* (1951).

1.1.1. Evaluation de l'activité de la SOD

Le dosage de l'activité de la SOD cardiaque était réalisé selon la méthode décrite par Marklund (1976), fondée sur l'inhibition de l'oxydation du pyrogallol avec l' $O_2^{\cdot -}$ par la SOD. La réalisation d'une droite de référence de la $\Delta DO/min$ à partir d'une gamme de solutions de SOD commerciale (de 0 à 25 mg/L) permettait d'évaluer la concentration de SOD des échantillons tissulaires. La $\Delta DO/min$ était déterminée par spectrophotométrie à 410 nm.

1.1.2. Evaluation de l'activité de la CAT

Le dosage de l'activité de la CAT cardiaque était réalisé selon la méthode décrite par Beers & Sizer (1952), fondée sur la décomposition de l' H_2O_2 par la CAT. L'activité de la CAT était déterminée par spectrophotométrie suivant la disparition de l' H_2O_2 à 240 nm.

1.1.3. Evaluation de l'activité de la GPx.

Le dosage de l'activité de la GPx cardiaque était réalisé selon la méthode décrite par Flohe & Gunzler (1984), fondée sur l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) par la GPx parallèlement à la réduction des hydroperoxydes en alcool. Ensuite, le GSSG, dont la concentration est dépendante de l'activité de la GPx, est à nouveau réduit par la glutathion reductase en présence de NADPH. L'activité de la GPx était alors déterminée par spectrophotométrie suivant la décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm.

2.1. Capacité antioxydante myocardique totale (études n°2 et n°3)

L'évaluation de la capacité antioxydante myocardique totale permet de quantifier les capacités du cœur à éliminer les RLO à partir des systèmes de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques.

2.1.1. Préparation des échantillons

Les tissus myocardiques prélevés étaient homogénéisés dans un tampon PBS (NaCl : 137 mM, KCl : 24 mM ; Na₂HPO₄ : 19 mM ; KH₂OP₄ : 18 mM ; pH = 7) à 4°C à l'aide d'un homogénéiseur/disperseur (T10 Ultra Turrax® ; IKA). Les homogénats étaient ensuite centrifugés à 3000 g pendant 12 minutes à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires. La quantité de protéines de chaque homogénat ainsi obtenu était évaluée avec un kit de dosage BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific), afin de préparer des échantillons de même concentration protéique connue (dilution avec du PBS). Ces échantillons étaient utilisés pour l'évaluation de la capacité antioxydante myocardique.

2.1.2. Evaluation de la capacité antioxydante myocardique

L'évaluation de la capacité antioxydante myocardique totale a été évaluée à l'aide d'un kit TAP (*Total Antioxydant Power* Kit (TAO2) ; Oxford Biomedical Research). Le principe de mesure du TAP repose sur l'évaluation de la capacité de l'échantillon à réduire du Cu²⁺ en Cu⁺, modifiant ainsi les caractéristiques d'absorbance ionique. La forme réduite de cuivre produite s'associe alors au réactif chromogénique du kit de manière à former un complexe stable (2 : 1) d'absorption maximale à 450 nm. Une gamme de calibration était réalisée avec des concentrations connues de Trolox (de 0 à 2 mM), un antioxydant dérivé de la vitamine E, permettant d'exprimer la capacité antioxydante de l'échantillon en mM de Trolox. La capacité

antioxydante totale était ainsi déterminée par spectrophotométrie suivant l'augmentation de l'absorption de la solution cuivrée à 450 nm.

2. Activité de la LDH dans les effluents coronaires au cours de l'IR (étude n°1)

Les dosages de la LDH, utilisée comme marqueur de mort cellulaire, étaient effectués à partir du recueil des effluents coronaires à 5 minutes de reperfusion. L'évaluation de l'activité de la LDH était effectuée à l'aide d'un kit de dosage de LDH (LDH-P, BIOLABO SA, France), fondé sur la réaction du pyruvate avec le NAD pour former du lactate et du NADH, catalysée par cette enzyme. L'activité de la LDH était déterminée par spectrophotométrie suivant la disparition du NAD à 340 nm. La quantité de LDH libérée dans les effluents coronaires a été exprimée en U/min.

3. Production de NO dans les effluents coronaires au cours de l'IR (études n°2 et n°3)

La production de NO cardiaque a été évaluée dans les effluents coronaires recueillis au cours du protocole d'IR, à l'aide d'un kit de dosage des dérivés nitrés (nitrites/nitrates) (QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit (DINO-250); BioAssay Systems) basé sur la méthode de Griess. Bien que la quantité de NO soit évaluée indirectement *via* la formation de nitrites, cette méthode est classiquement rapportée dans la littérature (Ikeda *et al.*, 1995 ; Kobara *et al.*, 2003 ; Bertuglia, 2008). Brièvement, le NO présent dans l'échantillon est naturellement oxydé en nitrites et nitrates ; ces derniers sont réduits en nitrites par une incubation de 15 minutes de l'échantillon avec des granules de cadmium. Le nitrate ainsi formé va ensuite réagir avec de l'acide sulfanilique en milieu acide pour former un sel

diazonium, qui va lui-même réagir avec une amine aromatique et ainsi produire un colorant azoïque. La quantité totale de nitrites ainsi formés est alors déterminée par spectrophotométrie à 540 nm.

4. Western blots

4.1. Extraction et préparation des échantillons

Les échantillons ventriculaires congelés étaient broyés à l'aide d'un homogénéiseur/disperseur (T10 Ultra Turrax® ; IKA) dans un tampon d'extraction SB (50 mM de Tris-HCl, pH = 6.7 ; 1% SDS ; 10% glycérol ; inhibiteur de protéase (Protease inhibitor cocktail ; Sigma-Aldrich) ; inhibiteur de phosphatase (NaOV ; Fischer Scientific)), à 4°C. L'homogénat obtenu était ensuite centrifugé à 17 000 g pendant 12 minutes à 4°C afin de ne conserver que le contenu cytosolique. Le surnageant était ensuite récupéré, réparti en plusieurs aliquots puis congelé à - 80°C.

4.2. Dosage des protéines

L'évaluation de la concentration en protéines des échantillons était réalisée avec un kit de dosage BCA (bicinchonidic acid) (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Le principe de ce dosage repose sur l'évaluation de la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines de l'échantillon. Le Cu^+ ainsi formé s'associe avec le BCA pour former un complexe (1:2) présentant une très forte absorbance à 562 nm, linéaire avec l'augmentation de la concentration en protéines. La quantité de protéines de l'échantillon est ainsi déterminée par rapport à une gamme étalon BSA (*Bovine Serum Albumin*) de concentrations protéiques connues (de 0 à 2 g/ml) après 30 minutes d'incubation à 37°C (100 μl

d'échantillon pour 2 ml de réactif BCA). Le dosage des protéines était réalisé par spectrophotométrie à 562 nm.

4.3. Western immunoblotting

Les échantillons étaient préparés avec du β -mercaptoéthanol (5%) et bouillis pendant 5 minutes à 95°C afin de dénaturer le contenu protéique. Une même quantité de protéines (50 à 100 μ g) de chaque échantillon était déposée et séparée par électrophorèse sur un gel polyacrylamide-SDS (6-12%) puis transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) à l'aide d'un appareil de transblot (Bio-Rad transfert apparatus ; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Un marqueur de poids moléculaire (EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder ; Fischer Scientific) était également déposé sur chaque gel. Pour l'évaluation du ratio eNOS dimère/monomère, toutes les procédures ont été réalisées en condition non-dénaturante. Pour cela les échantillons étaient préparés à froid, sans β -mercaptoéthanol, et les étapes d'électrophorèse et de transfert étaient réalisées à 4°C. Ensuite les membranes étaient incubées pendant 1 à 2 heures dans une solution de blocage TBS-T (Tris-buffered saline, 0.05% Tween 20 ; pH = 7.5) avec du lait à 10% ou de la BSA à 3%. Une fois cette étape terminée, les membranes étaient rincées 3 fois dans du TBS-T puis incubées sous agitation avec l'anticorps primaire spécifique pendant toute la nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés pour ces travaux sont: « *anti-rabbit* » SERCA-2a (1/12500 ; Badrilla), « *anti-mouse* » eNOS (1:1000; BD Transduction Laboratory), « *anti-mouse* » eNOS-P^{Ser1177} (1:1000; BD Transduction Laboratory), « *anti-mouse* » nNOS (1:500; BD Transduction Laboratory), « *anti-mouse* » iNOS (1:1000; BD Transduction Laboratory) « *anti-rabbit* » GAPDH (1:3000; Santa Cruz), « *anti-mouse* » GCH1 (1:500; Abnova), « *anti-rabbit* » nitrotyrosine (1:20000; Millipore Corporation). Ensuite les membranes étaient rincées 3 fois au TBS-T puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante. A nouveau les immunoblots étaient soigneusement rincés 4 fois au TBS-T puis

immergés dans un réactif luminescent ECL ou ECL+ (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrat; Thermo Scientific; Luminata™ Forte Western HRP substrate; Millipore Corporation, respectivement) afin de visualiser le signal par exposition à un film X-ray. Ce dernier était ensuite scanné et l'intensité du signal de l'immunoblot était quantifiée avec le logiciel ImageJ (ImageJ, NIH, USA). Les quantités de protéines évaluées ont été exprimées en fonction de la quantité de GAPDH de l'échantillon.

5. Evaluation de la peroxydation lipidique myocardique par dot blot

L'évaluation de la peroxydation lipidique a été effectuée par mesure de malondialdéhyde (MDA) des échantillons ventriculaires par dot blot. Ces derniers étaient préparés de manière identique à ceux utilisés pour les westerns blots, puis une même quantité protéique (7 µg) de chaque était déposée sur une membrane de nitrocellulose à l'aide de la micropipette (2 µl/échantillon). La membrane était ensuite mise à sécher pendant 2 heures à température ambiante, puis incubée dans une solution de blocage (TBST-T ; 5% lait) pendant 1 heure. Après 2 rinçages au TBS-T, la membrane était incubée sous agitation avec l'anticorps primaire « *anti-goat* » MDA (1:500; Millipore Corporation) pendant 1 heure à température ambiante, puis rincée de nouveau 3 fois et incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 heure à température ambiante. Enfin le signal de l'immunoblot était révélé à l'aide d'un kit luminescent ECL (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrat; Thermo Scientific) exposé à un film X-ray. L'analyse de l'intensité du signal était réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (ImageJ, NIH, USA). La quantité de MDA a été exprimée en fonction de la quantité totale de protéine déposée évaluée par coloration de la membrane au rouge Ponceau.

6. Evaluation du stress oxydant myocardique par résonance paramagnétique électronique (RPE)

6.1. Extraction et préparation des échantillons

Les homogénats d'échantillons ventriculaires étaient obtenus de manière identique à celle exposée dans la partie 4.1., et étaient ensuite centrifugés à 600 g pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer les noyaux et débris cellulaires. Le surnageant était ensuite récupéré puis congelé à - 80°C. La quantité de protéines de chaque homogénat ainsi obtenu était évaluée avec un kit de dosage BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific)

6.2. Mesures par RPE

6.2.1. Principe de la RPE et du "spin trapping"

La mesure par spectroscopie par RPE, couplée à une technique de « *spin trapping* » est une technique de référence pour l'évaluation du stress oxydant dans les tissus biologiques. Brièvement, le principe de mesure de RLO par RPE et « *spin trapping* » est le suivant.

La présence d'un ou plusieurs électrons non-appariés sur les molécules radicalaires confère à ces dernières une propriété paramagnétique lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique. La soumission de ces espèces radicalaires à un champ magnétique oscillant (micro-onde) provoque une transition des spins entre les différents niveaux électroniques permettant l'enregistrement de spectres RPE. Un spectre RPE est caractérisé par le champ auquel résonne l'échantillon (déterminé par le facteur g), le nombre et la position des raies. Ainsi, selon ces caractéristiques, le spectre enregistré est spécifique du composé évalué et son amplitude est proportionnelle à la concentration du radical évalué dans le milieu expérimental.

Cependant, dans les tissus biologiques, la demi-vie extrêmement brève des radicaux libres rend leur détection difficilement visualisable par RPE du fait de leur forte labilité. Leur détection requière alors une stabilisation préalable. Ceci est permis par l'emploi de piègeurs de radicaux libres : les « *spin trap* ». La réaction de piégeage du radical libre, résultant de la liaison covalente du « *spin trap* » avec le radical libre spécifique concerné, produit un nouveau composé paramagnétique plus stable et d'une durée de vie considérablement augmentée. Ce composé, lui aussi radicalaire, appelé « *spin adduct* », est détectable par spectroscopie RPE. L'amplitude des raies du spectre RPE enregistré est alors proportionnelle à la quantité de « *spin adducts* » formés, et de ce fait à la concentration du radical évalué dans le milieu biologique. Le « *spin trap* » spécifique de l' $O_2^{\cdot-}$ employé dans ce travail est le CMH (1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl-pyrrolidine) (Fig. II.9).

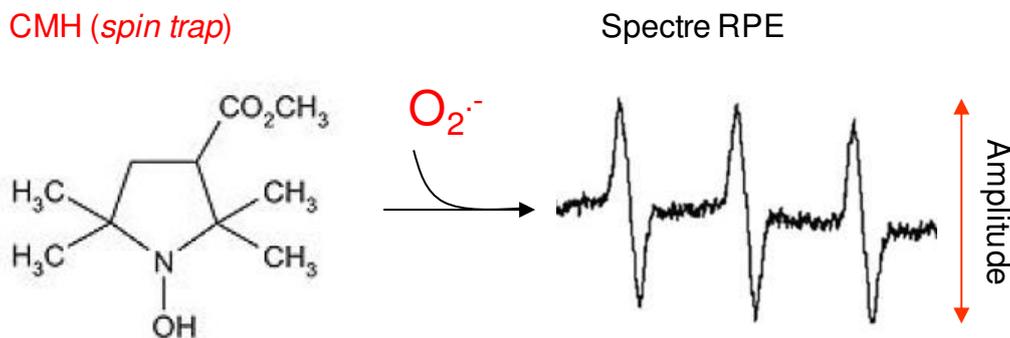


Figure II.9: Schématisation de l'enregistrement du spectre par résonance paramagnétique électronique (RPE) pour identifier l'anion superoxyde par « *spin trapping* ». CMH : 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthyl-pyrrolidine.

6.2.2. Protocole

Une solution à 1mM de CMH était préparée dans un tampon Krebs-Hepes (pH = 7.4) contenant 25 μ M de sel de chélation deferroxamine méthane-sulfonate (DF) et 5 μ M de sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (DETC). Les homogénats étaient mélangés avec la solution de CMH (1 :1) et 50 μ l de ce mélange réactionnel était prélevé dans le tube

capillaire EPR (Noxygen Science Transfer & Diagnostics, Germany). Ce dernier était ensuite placé à l'intérieur de la cavité du spectromètre (e-scan spectrometre ; Bruker, Germany) pour l'acquisition des données. La procédure était répétée sur le même échantillon mais en présence de L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ M). La différence entre ces 2 conditions permettait alors d'obtenir la production de RLO dépendante des NOS. L'enregistrement des spectres a été réalisé avec les paramètres d'acquisition RPE suivants : fréquence de micro-onde : 9.652 GHz; fréquence de modulation: 86 kHz; amplitude de modulation: 0,01 G; champ magnétique moyen au centre de la cuve: 3494.9 G ; champ balayé: 300 G, puissance micro-onde: 1.0 mW, nombre de scans: 10; gain: $2 \cdot 10^{-1}$. Après que la température des échantillons se soit stabilisée, celle-ci était ajustée à 37°C grâce au régulateur de température « Temperature & Gas Controller "Bio III" unit », relié au spectromètre. L'acquisition de la production d' $O_2^{\cdot -}$ dans la solution d'homogénat était effectuée et l'enregistrement des spectres était réalisé sur 5 minutes afin de calculer un taux de production radicalaire. L'amplitude du signal RPE était alors proportionnelle à la quantité d'électrons non-appariés, permettant ainsi d'être convertie en quantité absolue de micromoles produites ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). La quantité de RLO produits a été exprimée en fonction du contenu protéique de chaque échantillon.

V. TRAITEMENT STATISTIQUE

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm somme des écarts à la moyenne (SEM). Le traitement statistique des résultats a été réalisé à l'aide du logiciel Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Les effets des différentes conditions expérimentales (entraînement, exposition au CO, I/R, et drogues) et leurs interactions ont été évalués par une analyse de variance factorielle (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs selon l'étude. Les différents paramètres longitudinaux (variations de pressions, débits coronaires, etc) ont été traités par une ANOVA à mesures répétées. En cas d'interaction entre différents facteurs, des tests *post-hoc* (test PLSD de Fisher) ont été réalisés afin d'identifier les différences significatives *a posteriori*. Pour la comparaison de 2 moyennes, des tests *t* de Student sur valeurs non appariées ont été réalisés (analyses biochimiques). Enfin, la comparaison des différences de pourcentages de survenue des événements arythmiques a été réalisée à l'aide d'un test du Chi².

Pour l'ensemble du traitement statistique de ce travail, le seuil de significativité retenu était de $p \leq 0.05$. * : différence entre Sed vs. Ex ; \$: différence due à l'effet de l'exposition au CO ; # : différence due à l'effet de la L-NAME ; § : différence due à l'effet du BH₄ ; £ : différence entre Stab vs. Isch ; & : différence entre Isch vs. Reperf ; & : différence due à l'effet de l'EPI. Le nombre de rats utilisés pour les paramètres évalués étaient de : $n=10 \pm 2$ /groupe pour l'évaluation des paramètres fonctionnels cardiaques, de la taille de la zone infarctée, des dosages réalisées dans les effluents coronaires (LDH, production de NO) ; $n=5$ /groupe pour les dosages biochimiques ; $n=5$ /groupe pour les dosages par RPE ; $n=5$ /groupe pour le protocole de cardiomyocytes isolés.

Résultats

Etude n° 1

Prévention par l'exercice des effets délétères d'une exposition au CO sur l'homéostasie calcique cardiomyocytaire : implication dans la sensibilité à l'ischémie-reperfusion

Cette première étude a fait l'objet d'une publication dans

Am J Physiol Heart Circ Physiol :

Am J Physiol Heart Circ Physiol 299: H2076–H2081, 2010.
First published October 1, 2010; doi:10.1152/ajpheart.00835.2010.

Moderate exercise prevents impaired Ca²⁺ handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia-reperfusion

C. Farah,^{1*} G. Meyer,^{1*} L. André,² J. Boissière,¹ S. Gayrard,¹ O. Cazorla,² S. Richard,² F. Boucher,³ S. Tanguy,¹ P. Obert,¹ and C. Reboul¹

¹Research Laboratory EA 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences, Avignon University, Avignon; ²Research Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U637, Cardiovascular Physiopathology, Montpellier1 University, Faculty of Medicine, Montpellier; ³Research Laboratory, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5525 Physiologie Respiratoire Expérimental Théorique et Appliquée-TIMC, Grenoble University Joseph Fourier, Grenoble, France

Submitted 23 August 2010; accepted in final form 29 September 2010

I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs

L'émergence et la sévérité des pathologies coronariennes résultent d'une interaction complexe entre facteurs génétiques et environnementaux. Parmi ces derniers, l'implication de la pollution atmosphérique au CO est apparue dans le paysage scientifique depuis une vingtaine d'années comme un élément notable. En effet, de multiples études épidémiologiques ont fait état d'une corrélation entre le taux de pollution au CO et l'aggravation de la morbidité et mortalité cardiovasculaire (Burnett *et al.*, 1997 ; Mann *et al.*, 2002 ; Bell *et al.*, 2009). Ainsi les taux de pollution citadine au CO, rencontrés à des valeurs moyennes de 20 à 40 ppm mais pouvant atteindre des pics jusqu'à 170 ppm (Stern *et al.*, 1988), ont récemment été rapportés par Samoli *et al.* (2007) comme linéairement corrélés à la mortalité cardiovasculaire. L'exposition chronique à de faibles concentrations de CO telles que rencontrées en milieu urbain a en effet été montrée comme étant à l'origine d'une altération de l'homéostasie calcique cellulaire, caractérisée par une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique et une diminution de l'amplitude du transitoire calcique, pouvant ainsi contribuer à expliquer les troubles contractiles observés chez les populations de rats exposées à ce polluant (Bye *et al.*, 2008 ; André *et al.*, 2010). Ces troubles de l'homéostasie calcique cellulaire semblent pouvoir être expliqués dans ces études par une altération de la fonction et/ou du niveau d'expression des protéines impliquées dans la régulation des mouvements calciques, connues pour être sensibles au stress oxydant. En effet dans ces travaux, il a notamment été montré une diminution de l'expression des pompes SERCA-2a (André *et al.*, 2010) associée à une hyperphosphorylation RLO-PKA-dépendante des Ryr (André *et al.*, 2011), qui semblent pouvoir être expliquées par des effets pro-oxydants d'une exposition prolongée au CO (André *et al.*, 2011 ; Reboul *et al.*, 2012). Par ailleurs, d'autres travaux préalables du laboratoire (Meyer *et al.*, 2010) ont montré lors de l'utilisation d'un modèle équivalent d'exposition au CO que le remodelage phénotypique myocardique observé est à l'origine d'une plus importante vulnérabilité du myocarde à l'IR, notamment

expliquée par une aggravation de la surcharge calcique diastolique au cours de la reperfusion post-ischémique.

La pratique régulière d'un exercice en endurance est à ce jour clairement reconnue comme une stratégie de cardioprotection efficace (Ascensão *et al.*, 2007 ; de Waard *et al.*, 2007 ; Powers *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes d'une telle cardioprotection restent à investiguer, l'amélioration des défenses antioxydantes myocardiques sont amplement rapportées comme jouant un rôle majeur (Powers *et al.*, 1998 ; Demirel *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2003 ; French *et al.*, 2006). De plus, les effets bénéfiques de l'exercice sur la régulation des mouvements calciques cellulaires sont largement décrits (Wisloff *et al.*, 2001 ; 2002 ; Kemi *et al.*, 2007 ; Kemi & Wisloff 2010) et divers études ont rapporté que l'exercice permettait une normalisation de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours du développement de l'insuffisance cardiaque (Lu Lu *et al.*, 2002 ; Wisloff *et al.*, 2002 ; Medeiros *et al.*, 2008 ; Rolim *et al.*, 2002).

Les objectifs de cette première étude ont donc été d'évaluer i) les effets potentiellement protecteurs de l'exercice en endurance sur les troubles de l'homéostasie calcique rapportés après une exposition prolongée à une pollution de type citadine au CO, et ii) leurs conséquences sur la sensibilité du myocarde à l'IR.

II. Résultats

1. Effets de l'exercice sur le développement d'un phénotype pathologique myocardique induit par l'exposition au CO

1.1. Homéostasie calcique et contractilité cardiomyocytaire

En accord avec les résultats précédemment rapportés par André *et al.* (2010), l'exposition au CO est responsable d'une altération de la fonction contractile cardiomyocytaire caractérisée par une diminution du raccourcissement sarcomérique (Fig. III.1 A&B). Cette dysfonction est associée à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique (Fig. III.2 A&B) et une diminution de l'amplitude du transitoire calcique (Fig. III.2 A&C). De plus, on observe suite à l'exposition au CO une réduction de la cinétique de décroissance du transitoire Ca^{2+} (τ) (Fig. III.3), mettant ainsi en évidence une altération des cinétiques de re-séquestration du Ca^{2+} dans le RS au cours de la phase diastolique. Telles que rapportées dans la littérature (André *et al.*, 2010; Bye *et al.*, 2008), ces altérations du repompage calcique sont associées à une moindre expression des pompes SERCA-2a du RS chez les rats CO-Sed lorsque comparés à leurs homologues contrôles (Fig. III.4). De manière intéressante, nous avons mis en évidence dans ce travail que la pratique d'un entraînement en endurance mené préalablement à l'exposition au CO et maintenu pendant les semaines d'exposition permettait de prévenir la dysfonction contractile cardiomyocytaire (Fig. III.1). Ce phénomène semble pouvoir être expliqué par une normalisation des mouvements calciques intracellulaires, caractérisée par i) une augmentation de l'amplitude du transitoire calcique (Fig. III.2 C), ii) une diminution de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique (Fig. III.2 B) et enfin iii) une amélioration des cinétiques de repompage du Ca^{2+} (Fig. III.3) associée à une restauration du niveau d'expression de SERCA-2a (Fig. III.4).

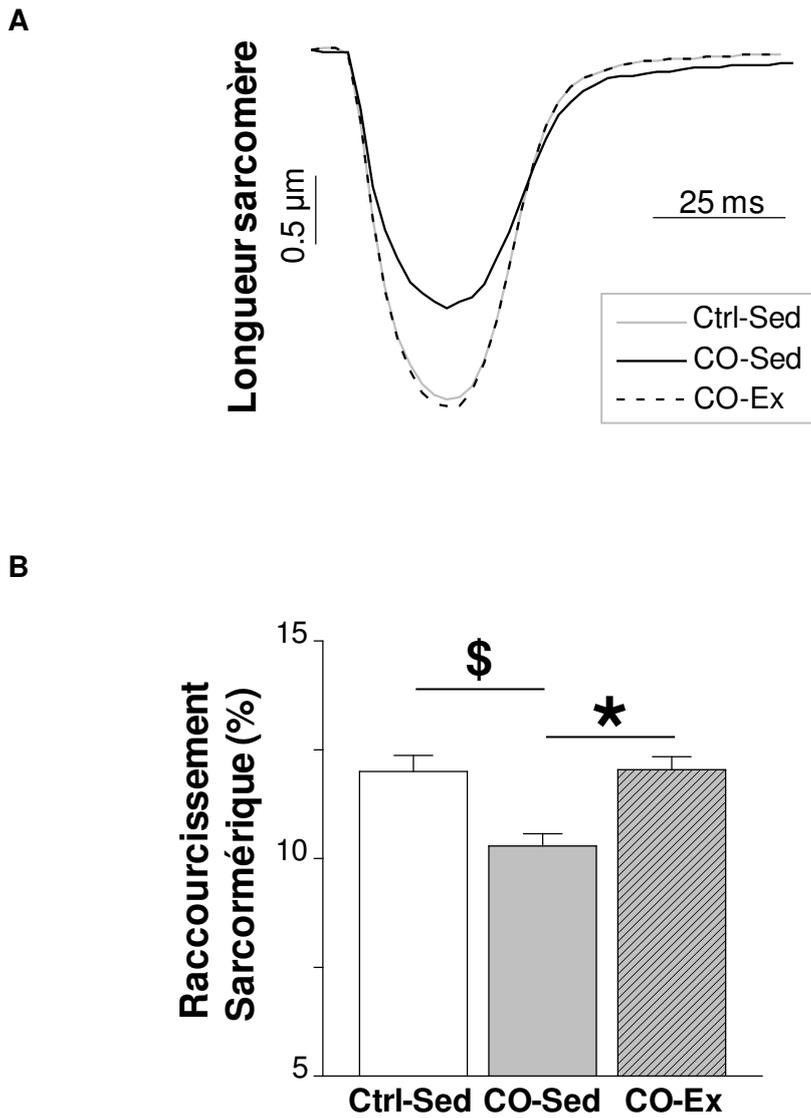


Figure III.1 : **A** : Représentation type du raccourcissement sarcomérique obtenu sur cardiomyocyte isolé intact stimulé à 0,5 Hz ; **B** : Raccourcissement sarcomérique, exprimé en pourcentage de la variation de longueur des sarcomères. \$ $p < 0,05$ CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * $p < 0,05$ CO-Ex vs. CO-Sed.

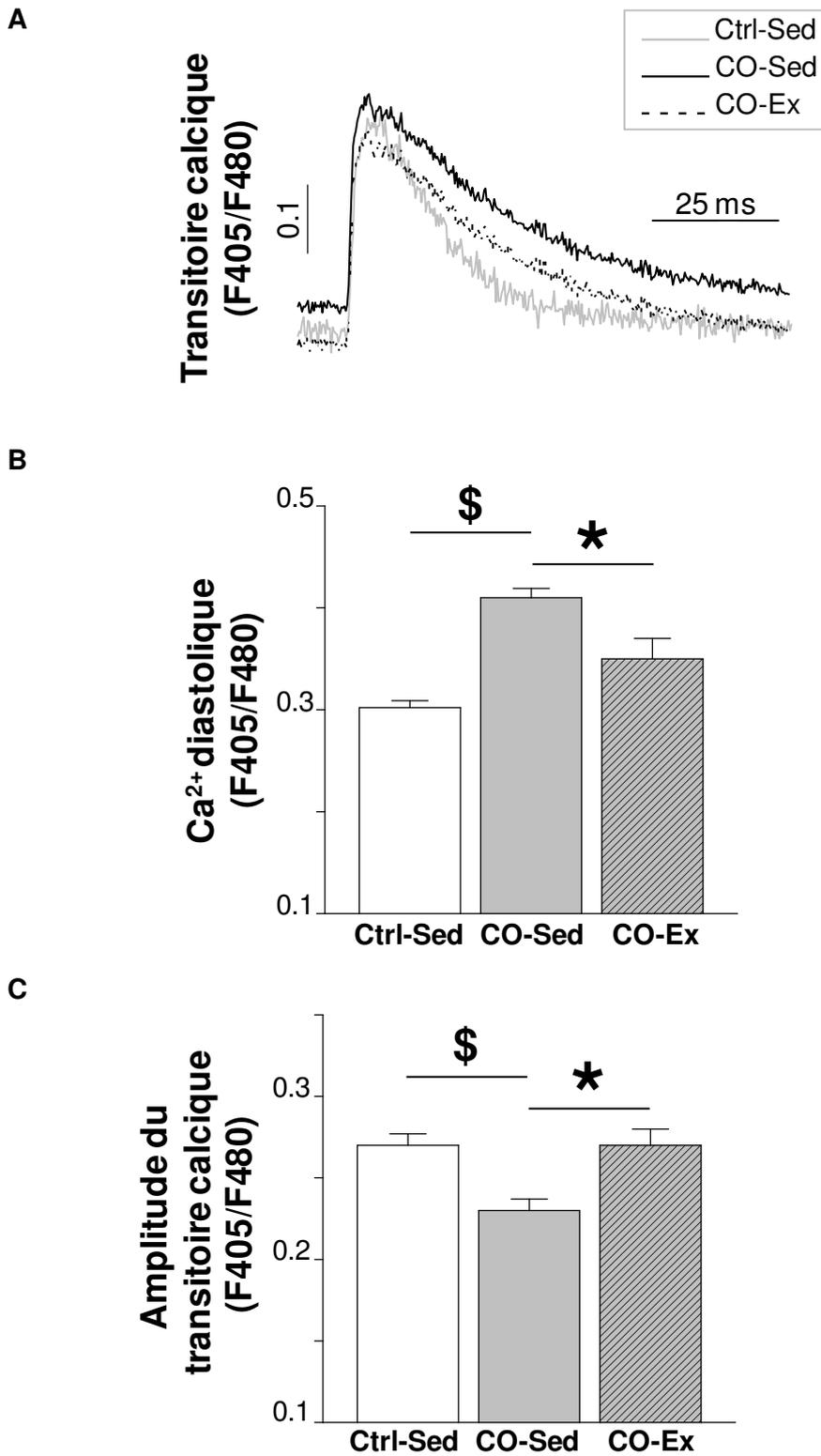


Figure III.2 : **A** : Représentation type du transitoire calcique obtenu sur cardiomyocyte stimulé à 0,5 Hz ; **B** : Calcium diastolique ; **C** : Amplitude du transitoire calcique. \$ $p < 0,05$ CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * $p < 0,05$ CO-Ex vs. CO-Sed.

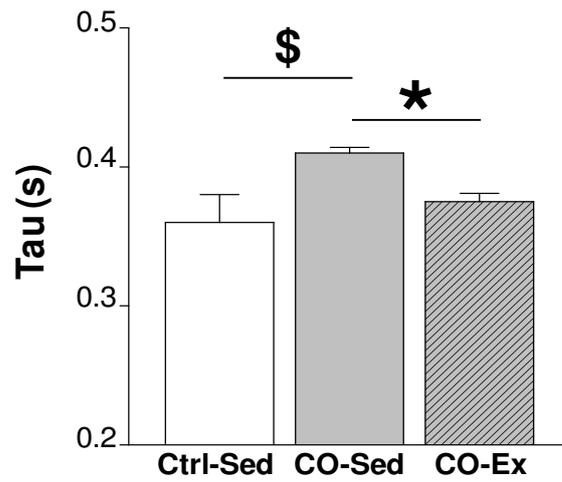


Figure III.3 : Evaluation de la cinétique de repompage du calcium d'un cardiomyocyte stimulé à 0,5 Hz. \$ $p < 0,05$ CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * $p < 0,05$ CO-Ex vs. CO-Sed.

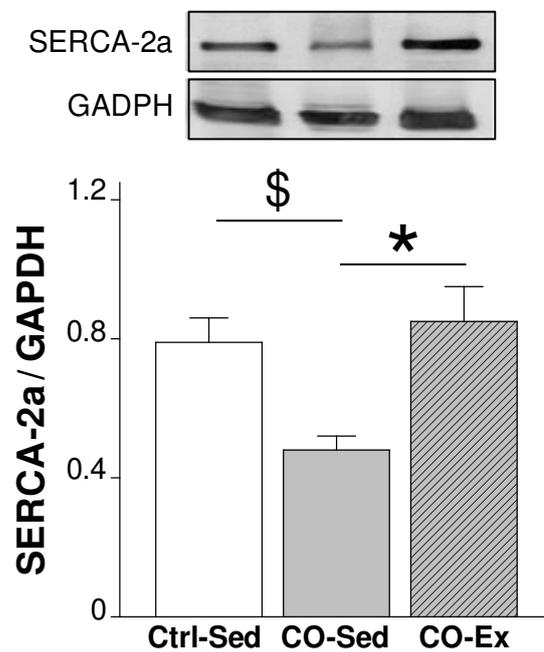


Figure III.4 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de SERCA-2a. \$ $p < 0,05$ CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * $p < 0,05$ CO-Ex vs. CO-Sed.

1.2. Statut enzymatique antioxydant myocardique

Les protéines régulant l'homéostasie calcique étant sensibles aux variations de l'état redox de la cellule (Zima & Blatter, 2006), dans un second temps nous nous sommes intéressés aux effets potentiellement bénéfiques de l'exercice sur le statut enzymatique antioxydant. Suite aux différents séjours expérimentaux, des lots de cœurs ont été congelés afin d'évaluer les effets du CO et de l'exercice sur le statut enzymatique antioxydant myocardique. Comme il a préalablement été montré par André *et al.* (2010), l'exposition chronique au CO est à l'origine d'une diminution des défenses enzymatiques antioxydantes cardiaques, caractérisée ici par une diminution de l'activité de la SOD (Fig. III.5 A) et de la GPx (Fig. III.5 B) chez les rats CO-Sed comparés aux rats Ctrl-Sed, sans effet sur l'activité de la CAT (Fig. III.5 C). Un résultat important de cette étude est que la pratique d'exercice physique chronique réalisée antérieurement à l'exposition au CO permet de totalement prévenir ces altérations en maintenant les niveaux d'activité de la SOD (Fig. III.5 A) et de la GPx (Fig. III.5 B) des rats CO-Ex aux niveaux de ceux des rats Ctrl-Sed. Aucun effet de l'exercice n'est observé sur l'activité de la CAT (Fig. III.5 C).

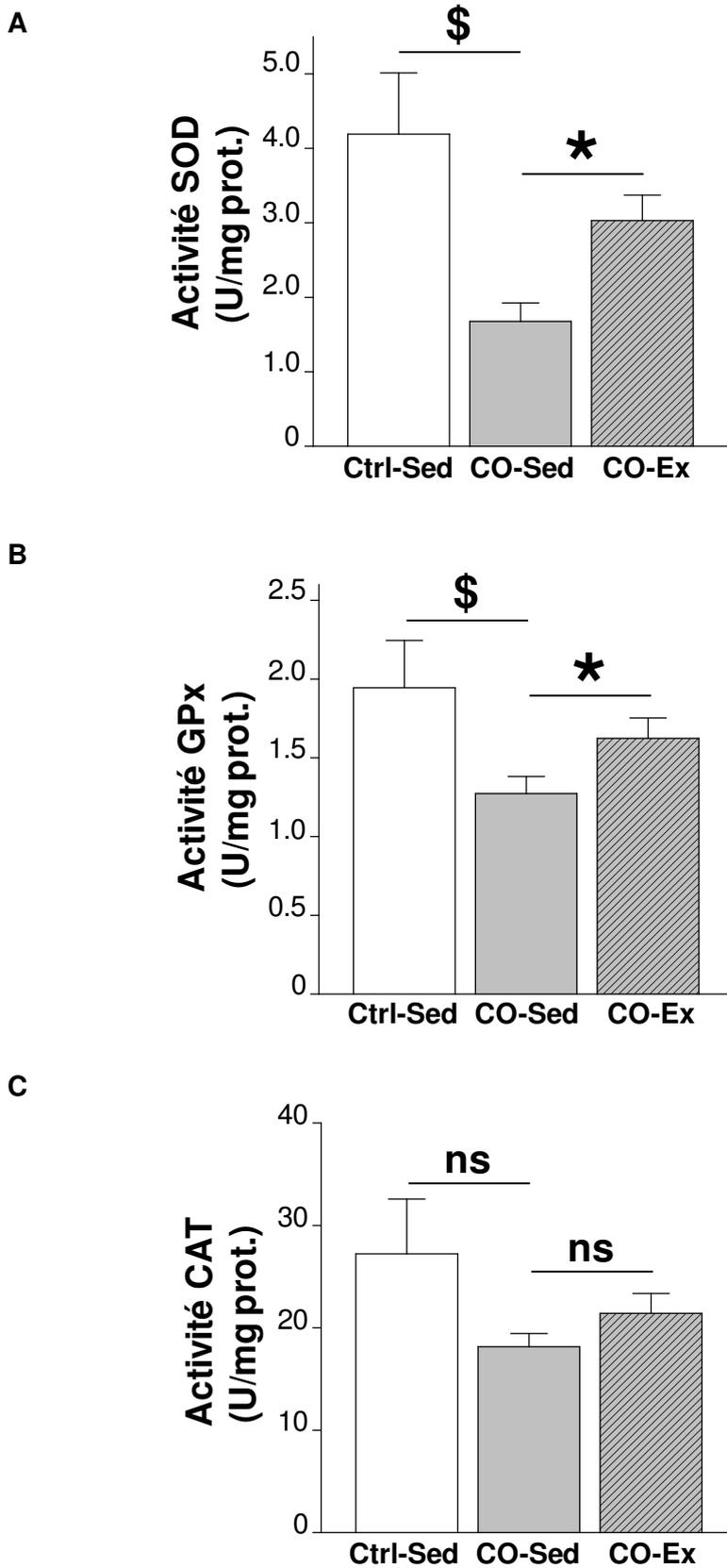


Figure III.5 : **A** : Activité enzymatique myocardique de la SOD ; **B** : Activité enzymatique myocardique de la GPx ; **C** : Activité enzymatique myocardique de la CAT. ns : non significatif ; \$ $p < 0,05$ CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * $p < 0,05$ CO-Ex vs. CO-Sed.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la pratique d'exercice en endurance permet de prévenir le développement d'un phénotype cardiomyocytaire pathologique induit par l'exposition de type citadine au CO. De plus, étant donné la sensibilité de la machinerie contractile et des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique au stress oxydant (Bolli R, 1999 ; Kuster *et al.*, 2010), il semble que le maintien du statut enzymatique antioxydant myocardique par l'exercice puisse être impliqué dans la préservation du CEC des rats CO-Ex.

2. Effets de l'exercice sur l'aggravation de la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR induite par l'exposition au CO

Dans un second temps, nous avons évalué si la prévention par l'exercice du développement d'un phénotype pathologique induit par l'exposition au CO permettait de prévenir l'aggravation de la sensibilité du myocarde à l'IR préalablement observée chez les rats exposés au CO (Meyer *et al.*, 2010). Pour cela, à la fin des différentes conditions expérimentales, un protocole d'IR régionale a été réalisé et la mort cellulaire ainsi que les arythmies de reperfusion ont été évaluées.

2.1. Les arythmies de reperfusion

Les troubles du rythme post-ischémiques constituent une des lésions de reperfusion majeure étant donné leur possible responsabilité dans la survenue de mort soudaine au cours des premières minutes de reperfusion. Ainsi, afin de mesurer les effets de l'exposition au CO et de l'exercice sur la sensibilité du myocarde à l'IR, nous avons évalué l'apparition des arythmies de reperfusion sévères en quantifiant les FV réversibles et irréversibles (Fig. III.6 A). Bien que l'exposition au CO ne soit pas responsable d'une augmentation significative

de l'apparition des FV (Ctrl-Sed : 33% vs. CO-Sed : 50% ; exprimé en pourcentage du nombre de rats par groupe ; Fig. III.6 B), on observe chez les rats CO une augmentation de la sévérité des FV. En effet, 25% des rats CO-Sed ont développé des FV irréversibles, alors qu'aucunes n'ont été observées chez les rats Ctrl-Sed (Fig. III.6 B). Un résultat important de cette étude est que l'exercice a permis de totalement prévenir l'incidence et la gravité de ces arythmies de reperfusion induites par le CO, puisqu'aucun rat CO-Ex n'a développé de FV (Fig. III.6 B).

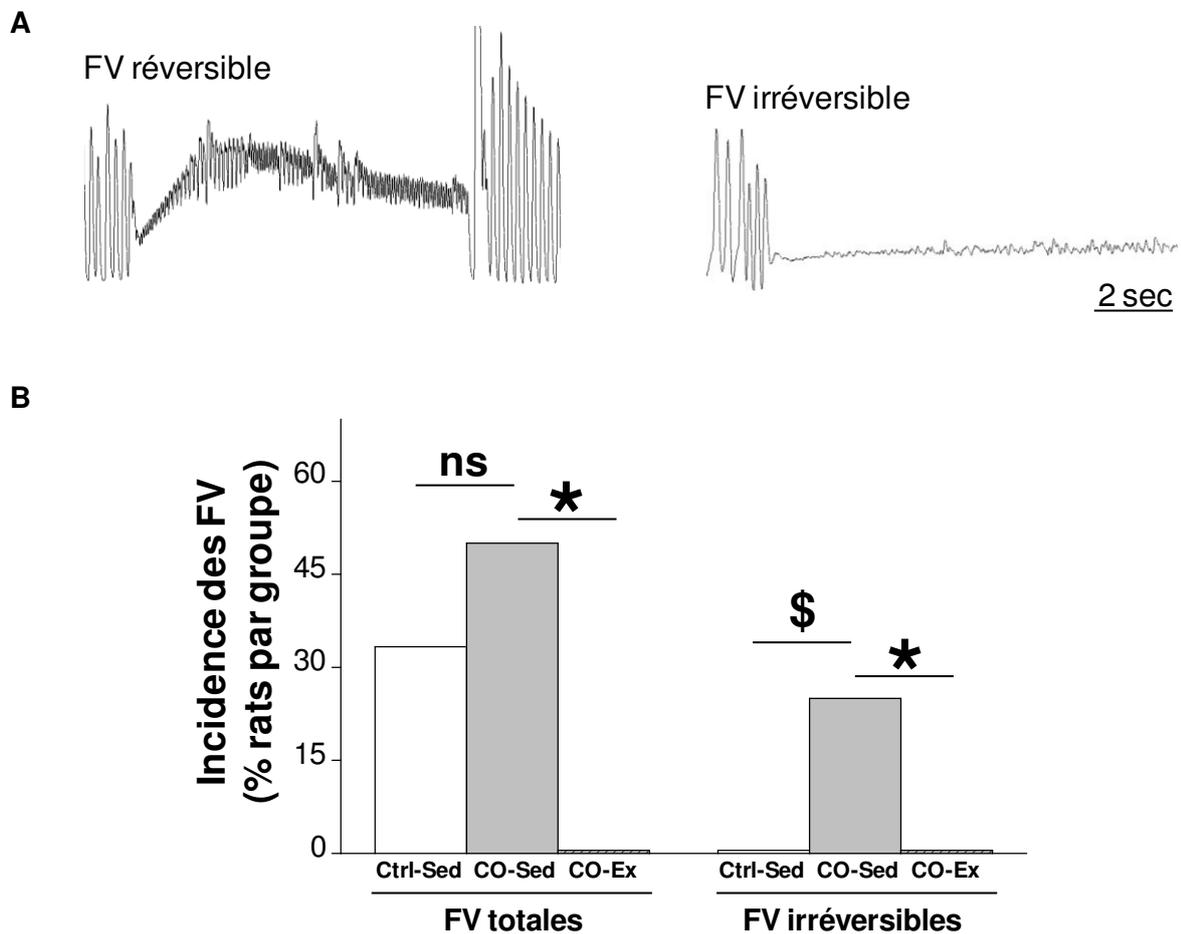


Figure III.6 : **A** : Représentations des tracés de fibrillations ventriculaires (FV) réversibles et irréversibles lors de la reperfusion; **B** : Incidence des FV totales et irréversibles lors de la reperfusion, exprimée en pourcentage du nombre de rats par groupe expérimental. ns : non significatif ; \$ $p < 0,05$ CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * $p < 0,05$ CO-Ex vs. CO-Sed.

2.2. La mort cellulaire

L'exposition chronique de type citadine au CO est responsable d'une augmentation de la sensibilité du myocarde à l'IR, marquée par une nette aggravation de la taille de la ZI chez les rats CO-Sed lorsque comparés aux rats Ctrl-Sed (Fig. III.7 A). Ce résultat est confirmé par l'augmentation du relargage de LDH dans les effluents coronaires, utilisé comme un marqueur de mort cellulaire, chez les rats CO-Sed (Fig. III.7 B). Cette mort cellulaire accrue chez la population de rats CO-Sed est entièrement prévenue par la pratique régulière d'un exercice avant puis pendant la période d'exposition au CO. En effet, notre modèle d'entraînement a permis de normaliser la taille de la ZI ainsi que le relargage de LDH des rats CO-Ex aux niveaux de ceux rapportés chez les rats Ctrl-Sed (Fig. III.7).

III. Bilan de cette étude

Les travaux réalisés dans cette première étude ont permis de mettre en évidence l'effet préventif d'une pratique en endurance d'intensité modérée sur l'aggravation de la vulnérabilité du myocarde au syndrome d'IR induite par une exposition au CO. En effet, les travaux de André *et al.* (2010), ainsi que Meyer *et al.* (2010) avaient préalablement démontré la toxicité d'une telle exposition sur le CEC cardiomyocytaire et le statut antioxydant myocardique, alors responsables du développement d'un phénotype pathologique à l'origine de l'exacerbation de la sensibilité du myocarde à l'IR. Dans ce travail, nous montrons que le maintien avec l'exercice du statut enzymatique antioxydant et la prévention des troubles de l'homéostasie calcique chez les rats entraînés exposés au CO sont associés à une normalisation de la sensibilité du myocarde à l'IR.

Dans cette première partie du travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets cardioprotecteurs de l'exercice dans la prévention du développement d'un phénotype cardiaque vulnérable à l'IR. Dans les études suivantes, qui constituent le corps de ce travail de thèse, nous avons focalisé notre investigation sur les mécanismes intrinsèques associés à la cardioprotection par l'exercice sur l'IR chez un modèle de rats sains, en centrant notre travail sur le rôle de la eNOS.

Etude n°2

**Cardioprotection par l'exercice : quel rôle
pour la eNOS ?**

I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs

L'exercice chronique en endurance est largement reconnu comme une stratégie efficace de cardioprotection (Ascensão *et al.*, 2007; French *et al.*, 2008 ; Powers *et al.*, 2008). Bien que les mécanismes impliqués n'aient été que peu investigués, de multiples études s'accordent sur l'amélioration du statut antioxydant cardiaque comme jouant un rôle essentiel dans cette cardioprotection (Powers *et al.*, 1998 ; Hamilton *et al.*, 2003 ; French *et al.*, 2006). D'autre part, les effets bénéfiques de l'exercice sur la santé cardiovasculaire sont amplement décrits comme étant liés à une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la eNOS, faisant de cette enzyme une cible majeure des adaptations à l'exercice (Sessa *et al.*, 1994 ; Hambrecht *et al.*, 2003 ; Lauer *et al.*, 2005 ; Zang *et al.*, 2009). Par ailleurs, la eNOS constitue un facteur décisif dans la modulation de la sensibilité du cœur à l'IR. En effet l'augmentation ou le maintien de son activité fonctionnelle ont été largement rapportés comme permettant de réduire la sévérité des lésions de reperfusion (Brunner *et al.*, 2003 ; Tiefenbacher *et al.*, 2003 ; Frantz *et al.*, 2009), tandis que son découplage fonctionnel est reconnu comme massivement impliqué dans leurs aggravations (Carnicer *et al.*, 2012). Néanmoins, jusque très récemment, aucune étude n'avait investigué son implication potentielle dans la cardioprotection induite par l'exercice. Très récemment, Calvert *et al.* (2011) ont démontré que l'augmentation par l'exercice de la phosphorylation de eNOS- P^{Ser1177} était impliquée dans cette stratégie de cardioprotection, notamment *via* une augmentation des stocks de métabolites du NO (nitrosothiols, nitrites). Toutefois dans ce travail les auteurs ne se sont pas intéressés aux modulations de l'état fonctionnel de la eNOS au cours des périodes d'ischémie et de reperfusion.

Dans cette première étude nous avons donc émis l'hypothèse que l'exercice permet de limiter la sévérité des lésions de reperfusion *via* une activation et un maintien de l'état fonctionnel de la eNOS au cours de l'IR.

II. Résultats

Dans cette étude, nous avons tout d'abord évalué les effets d'une pratique chronique en endurance d'intensité modérée sur les modifications d'expressions des NOS. Plus particulièrement, cette étude s'est intéressée au rôle de la eNOS et à la modulation de son état fonctionnel au cours de l'IR chez la population de rats entraînés.

1. Expressions des NOS et régulation post-transcriptionnelle de la eNOS : impacts de l'exercice

Aucune modification du pattern d'expression des NOS n'est rapportée chez la population de rats entraînés lorsque comparée à celle des rats sédentaires. En effet, 5 semaines d'exercice régulier à intensité modérée n'ont eu aucun effet sur l'expression de la eNOS (Fig. III.8), de la nNOS (Fig. III.9) et de la iNOS (Fig. III.10). Toutefois, en accord avec la littérature (Hambrecht *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2009 ; Calvert *et al.*, 2011), les rats entraînés présentent une augmentation significative de l'état de phosphorylation de la eNOS sur son résidu Ser¹¹⁷⁷, reconnu comme son site d'activation (Fig. III.8). De manière intéressante et novatrice, nous avons également observé une augmentation de l'état couplé de la eNOS, caractérisée par une augmentation du ratio dimère/monomère de eNOS chez les rats entraînés par rapport à leurs homologues sédentaires (Fig. III.11). Pour tenter d'expliquer cette augmentation de l'état couplé de eNOS chez les rats Ex, nous avons mesuré le niveau d'expression de la GCH-1, reconnue comme étant l'enzyme limitante dans la synthèse de BH₄. Toutefois aucun effet de l'exercice n'a été observé sur le niveau d'expression de GCH-1 (Fig. III.12).

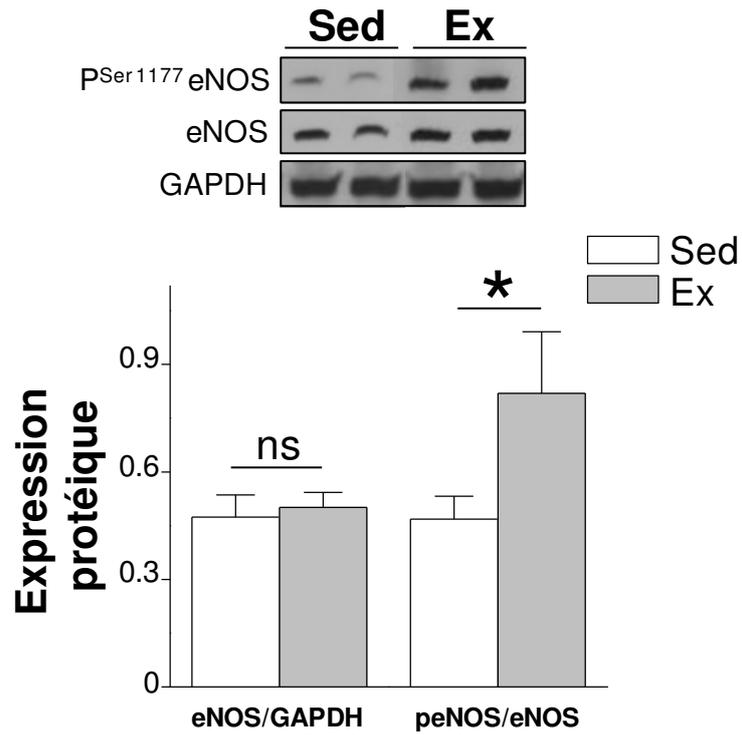


Figure III.8 : Evaluation par western blot de l'expression et du niveau de phosphorylation (Ser¹¹⁷⁷) de la eNOS cardiaque. ns : non significatif ; * p<0,05 Ex vs. Sed.

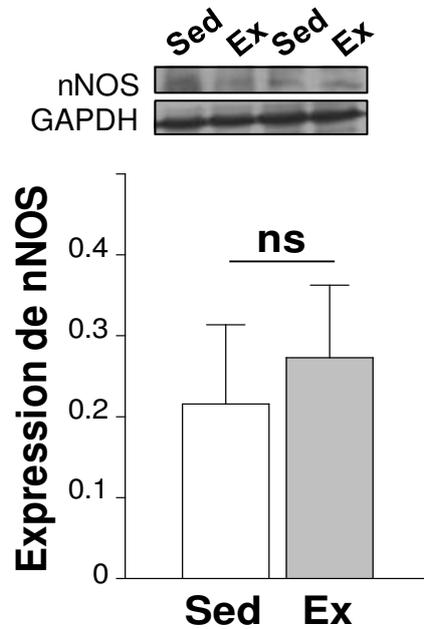


Figure III.9 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de nNOS.
ns : non significatif.

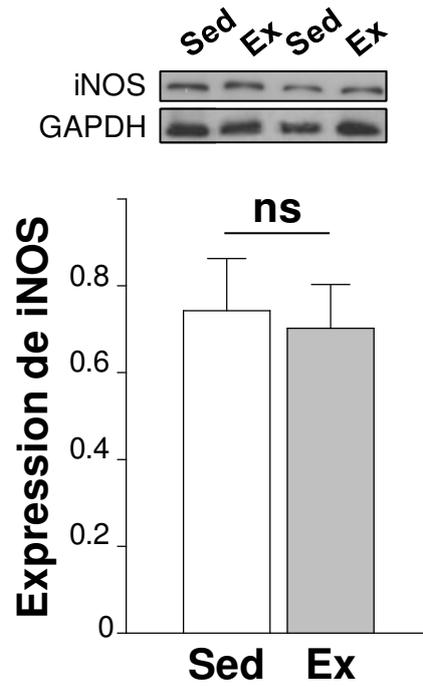


Figure III.10 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de iNOS. ns : non significatif.

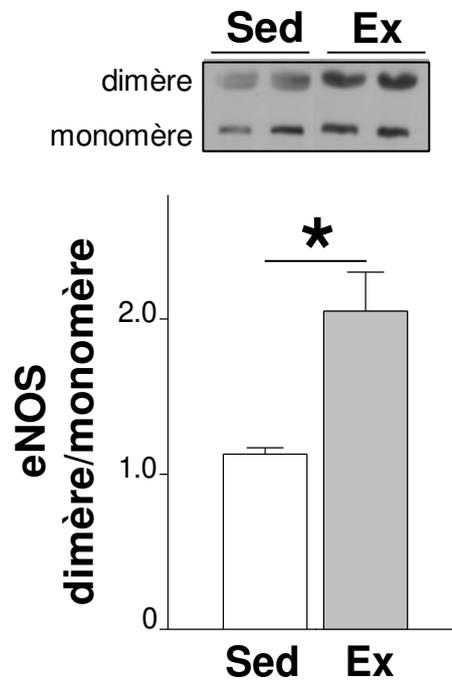


Figure III.11 : Evaluation par western blot du ratio dimère/monomère de eNOS. * $p < 0,05$ Ex vs. Sed.

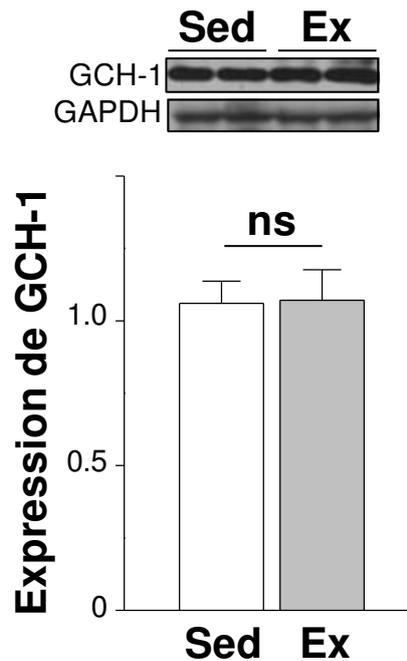


Figure III.12 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de GCH-1.
ns : non significatif.

2. Modulation de la sensibilité du cœur à l'IR par l'exercice : rôle de la eNOS

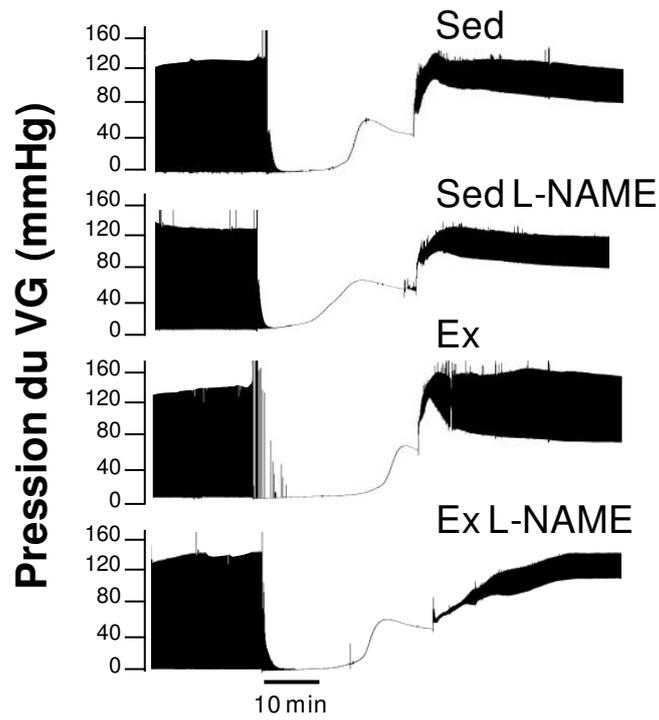
2.1. La fonction myocardique

La fonction cardiaque a été mesurée en continu tout au long du protocole d'IR. L'exercice est couramment rapporté dans la littérature scientifique comme permettant notamment d'améliorer la récupération fonctionnelle au cours de la reperfusion post-ischémique (Demirel *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2001 ; 2003). Ce résultat est confirmé dans notre travail puisque les rats Ex présentent une récupération fonctionnelle cardiaque post-ischémique significativement améliorée par rapport aux rats Sed. Cette meilleure récupération fonctionnelle est notamment caractérisée par une augmentation de la pression développée (Pdev) par le cœur (Fig. III.13 A&B) et une amélioration des indices de contractilité et de

relaxation myocardique (dP_{max}/dt et dP_{min}/dt) au cours des premières minutes de reperfusion (Tableau III.1).

Un résultat majeur de cette étude, est que la perfusion de L-NAME, réalisée 5 minutes avant et après l'ischémie, a totalement aboli les effets bénéfiques de l'exercice sur la récupération fonctionnelle myocardique, tandis qu'aucun effet n'a été observé chez les rats Sed. En effet, au cours de la reperfusion post-ischémique, aucune différence de récupération fonctionnelle (Fig. III.13 A&B) et des indices de contraction (dP/dt_{max} , Tableau III.1) et de relaxation myocardique (dP/dt_{min} , Tableau III.1) n'est observée entre les cœurs de rats Ex+L-NAME et les cœurs de rats Sed. Etant donné l'absence d'effets de l'exercice sur la nNOS et la iNOS, il semble donc que la eNOS puisse jouer un rôle non négligeable dans la cardioprotection fonctionnelle induite par l'exercice.

A



B

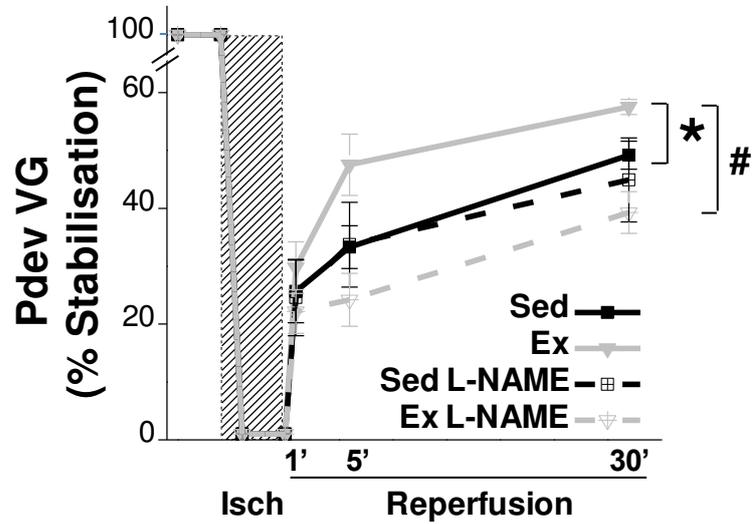


Figure III.13 : **A** : Représentation des tracés de pression du ventricule gauche au cours de l'IR. **B** : Pression développée par le ventricule gauche au cours du protocole d'IR chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec de la L-NAME 5 minutes avant et après l'ischémie. * $p < 0,05$ Ex vs.Sed ; # $p < 0,05$ Ex vs. Ex+L-NAME.

	Paramètres fonctionnels			
	dP/dt min (% stab)		dP/dt max (% stab)	
	5' reperf	30' reperf	5' reperf	30' reperf
Sed	24,28 ± 2,73	44,19 ± 3,01	22,61 ± 2,40	43,57 ± 2,86
Ex	37,40 ± 5,14 *	52,90 ± 2,06	34,06 ± 4,23 *	50,55 ± 1,04
Sed+L-NAME	28,82 ± 5,60	49,37 ± 7,70	26,37 ± 5,91	47,67 ± 7,58
Ex+L-NAME	20,80 ± 2,91 #	39,10 ± 3,59 #	18,77 ± 2,46 #	36,42 ± 3,60 #

Tableau III.1 : Evaluation des dérivées minimales (dP/dt min) et maximales (dP/dt max) de pression par rapport au temps après 5 et 30 minutes de reperfusion. Valeurs exprimées en pourcentage des valeurs de stabilisation. * p<0,05 Ex vs.Sed ; # p<0,05 Ex vs. Ex+L-NAME.

2.2. Débit coronarien

L'évaluation du débit coronarien a été réalisée en continu tout au long du protocole d'IR. Aucun effet spécifique de l'exercice n'a été observé sur ce paramètre, tant à l'état basal qu'au cours de la reperfusion (Tableau III.2). L'administration de L-NAME n'a induit aucune modification significative des débits de reperfusion des 2 populations expérimentales (Tableau III.2). Ce dernier résultat suggère que les effets cardioprotecteurs de l'exercice, impliquant la eNOS, ne semblent pas pouvoir être expliqués par une amélioration de la perfusion de l'organe au cours de la reperfusion.

	Débit coronarien (ml/min)			
	Stabilisation	5' reperf	10' reperf	30' reperf
Sed	13,18 ± 0,25	5,67 ± 0,35	6,60 ± 0,36	5,55 ± 0,41
Ex	13,31 ± 0,50	5,20 ± 0,34	5,88 ± 0,41	5,20 ± 0,19
Sed+L-NAME	--	6,47 ± 0,59	7,25 ± 0,61	5,58 ± 0,46
Ex+L-NAME	--	4,81 ± 0,37	5,84 ± 0,21	5,23 ± 0,28

Tableau III.2 : Débits coronariens au cours de la stabilisation et après 5, 10 et 30 minutes de reperfusion.

2.3. Taille de la zone infarctée

Critère majeur dans l'évaluation de la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion, la taille de la ZI a été évaluée suite à 30 minutes d'ischémie totale globale suivie de 2 heures de reperfusion. Les résultats, illustrés dans la Fig. III.14, ont permis de mettre en évidence une réduction significative de la taille de la ZI chez les rats Ex par rapport aux rats Sed. De manière comparable aux résultats observés sur la fonction myocardique, l'inhibition de NOS par administration de L-NAME a été responsable d'une perte de cardioprotection, caractérisée par une normalisation de la taille de la ZI chez les rats Ex+L-NAME au niveau de celle mesurée chez les rats Sed. Aucun effet de la perfusion de L-NAME n'a cependant été observé chez les rats Sed. Ces résultats suggèrent donc que la eNOS myocardique puisse jouer un rôle non négligeable dans la cardioprotection induite par l'exercice.

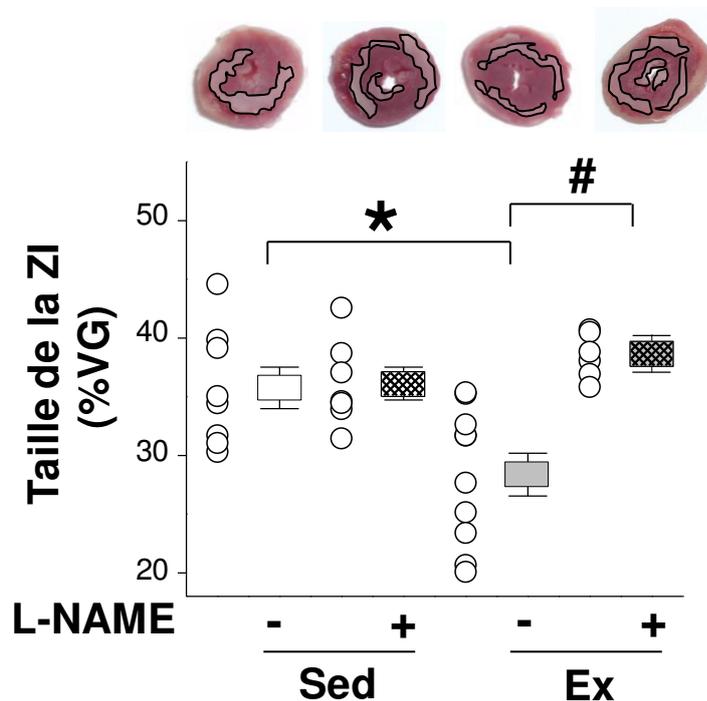


Figure III.14 : Taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec de la L-NAME 5 minutes avant et après l'ischémie. * $p < 0,05$ Ex vs.Sed ; # $p < 0,05$ Ex vs. Ex+L-NAME.

3. Effets de l'exercice sur la régulation post-transcriptionnelle de la eNOS au cours de l'IR

Après avoir confirmé le rôle que joue la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice, l'objectif de ce travail était dans un deuxième temps d'évaluer les effets de l'exercice sur la modulation de l'état fonctionnel de la eNOS au cours de l'IR, afin de tenter de mieux comprendre son rôle dans la moindre sensibilité du cœur au stress d'IR. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux modifications de son niveau de phosphorylation sur son site d'activation (Ser¹¹⁷⁷), et avons porté une attention toute particulière à son état de couplage (ratio dimère/monomère). De nombreuses études ont rapporté qu'une amélioration de la voie de synthèse de NO par la eNOS permettait de réduire la sensibilité du myocarde à l'IR (Elrod *et al.*, 2006 ; Frantz *et al.*, 2009 ; Keyes *et al.*, 2010). Il semble effectivement admis qu'un découplage de la eNOS puisse être à l'origine d'une aggravation des lésions de reperfusion (Nishijima *et al.*, 2011 ; Carnicer *et al.*, 2012), et que toute stratégie permettant son recouplage ou son maintien à l'état couplé puisse au contraire permettre de limiter ces lésions (Verma *et al.*, 2002 ; Tiefenbacher *et al.*, 2003 ; Dumitrescu *et al.*, 2007 ; Okazaki *et al.*, 2011). Dès lors, notre hypothèse dans cette seconde partie de l'étude était que l'amélioration du statut antioxydant myocardique, classiquement observée avec l'exercice (Hamilton *et al.*, 2003 ; French *et al.*, 2008 ; Powers *et al.*, 2008), devrait notamment permettre de limiter l'oxydation du BH₄ et ainsi améliorer le maintien de l'état couplé de la eNOS au cours de l'IR.

3.1. Statut antioxydant myocardique

Afin de tester notre hypothèse, nous avons dans un premier temps vérifié l'efficacité de notre protocole d'entraînement sur l'amélioration du statut antioxydant cardiaque. Pour cela, l'évaluation de la capacité antioxydante totale du myocarde a été réalisée sur des homogénats de cœur suite à la période d'entraînement. En accord avec les données de la

littérature, notre modèle d'exercice est associé à une augmentation de la capacité antioxydante cardiaque (Fig. III.15).

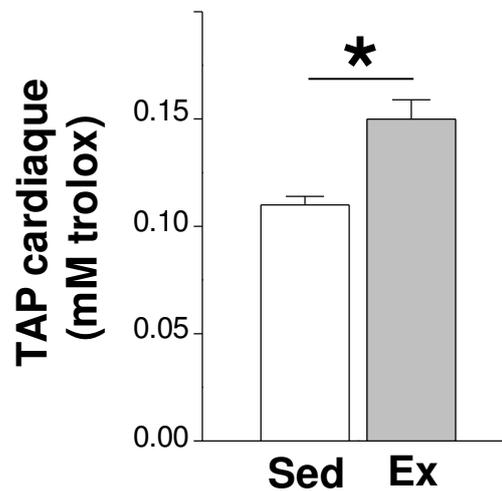


Figure III.15 : Capacité antioxydante totale du cœur (réalisée à l'aide d'un kit « *Total Antioxydant Power* », TAP). * $p < 0,05$ Ex vs. Sed.

3.2. Niveau de phosphorylation (Ser¹¹⁷⁷) de la eNOS au cours de l'IR

Dans cette partie nous avons comparé les modifications des niveaux de eNOS et de eNOS-P^{Ser1177}, au cours de l'IR, entre les deux populations expérimentales. Aucun effet de l'IR n'est observé sur le niveau d'expression de eNOS, et ce quelle que soit la population expérimentale (Fig. III. 16). L'ischémie est par contre à l'origine d'une nette diminution de eNOS-P^{Ser1177} chez les deux populations expérimentales, et cet effet apparaît plus marqué sur les cœurs de rats Ex (Sed : 57% vs. Ex : 88%). Ainsi, alors que le niveau de eNOS-P^{Ser1177} est supérieur chez les rats entrainés à l'état basal (Fig. III.8), après 30 minutes d'ischémie myocardique les cœurs de rats Ex présentent un niveau de eNOS-P^{Ser1177} inférieur à celui mesuré chez les cœurs de rats Sed. De manière intéressante, après 10 minutes de reperfusion, l'état de phosphorylation de la eNOS est restauré au niveau basal chez les Sed, ce qui n'est pas le cas chez les rats Ex. Ainsi, on observe à 10 minutes de

reperfusion un niveau de eNOS-P^{Ser1177} nettement inférieur chez les rats entrainés par rapport à leurs homologues sédentaires. Il est ainsi intéressant de constater que la cardioprotection par l'exercice s'accompagne d'une diminution du niveau de eNOS-P^{Ser1177} au cours des premières minutes de reperfusion.

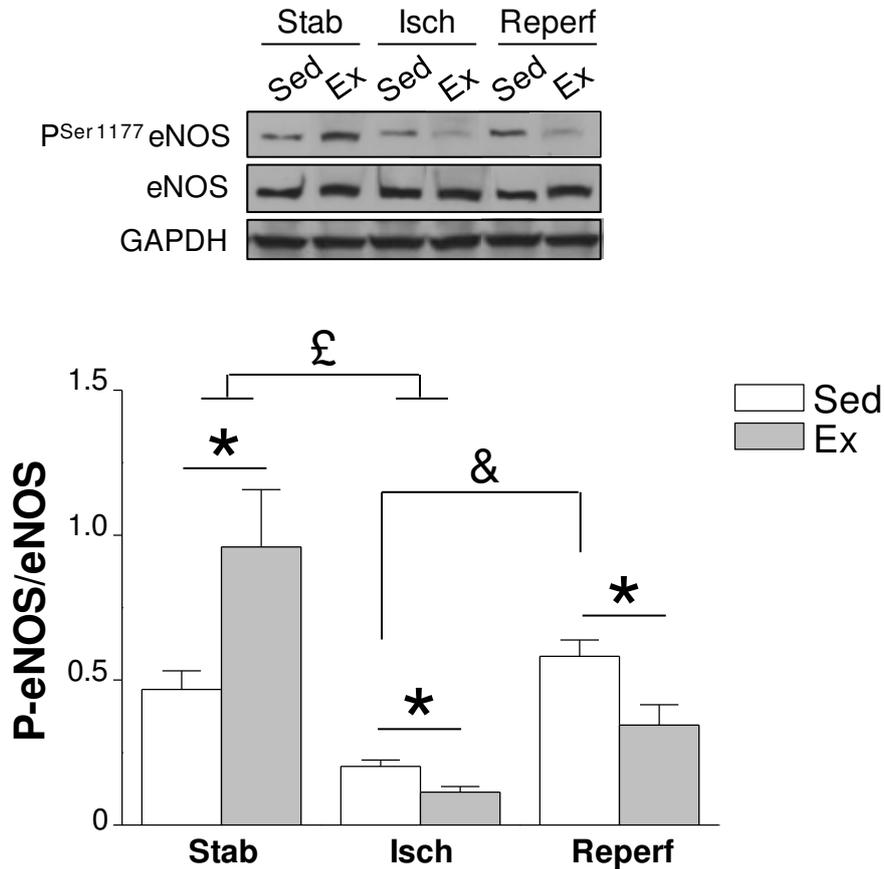


Figure III.16 : Evaluation par western blot de l'expression et de la phosphorylation de la eNOS (Ser¹¹⁷⁷) à l'état basal (Stab), après 30 minutes d'ischémie (Isch) et après 10 minutes de reperfusion (Reperf). * p<0,05 Ex vs. Sed ; £ p<0,05 Stab vs. Isch. & p<0,05 Isch vs. Reperf.

3.3. Etat de couplage de la eNOS au cours de l'IR

Nous avons observé que la période d'ischémie est à l'origine d'un important découplage de la eNOS chez les deux groupes expérimentaux, caractérisé par une diminution marquée

du ratio dimère/monomère de eNOS. Ce découplage de l'enzyme étant équivalent dans les deux groupes (diminution du ratio dimère/monomère de eNOS de 51% chez les deux populations), le ratio dimère/monomère de eNOS reste donc supérieur chez les cœurs de rats Ex comparés à ceux des rats Sed après 30 minutes d'ischémie (Fig. III.17). Un résultat inattendu de ce travail est que lors des premières minutes de reperfusion, alors que le ratio dimère/monomère de eNOS est restauré au niveau pré-ischémie chez les rats Sed, on constate une aggravation du découplage chez les rats Ex, marquée par une nette diminution du ratio dimère/monomère de eNOS. Contrairement à notre hypothèse de départ, la cardioprotection par l'exercice n'est donc pas associée à un meilleur maintien de l'état couplé de la eNOS au cours de la reperfusion, mais à un découplage significatif de celle-ci.

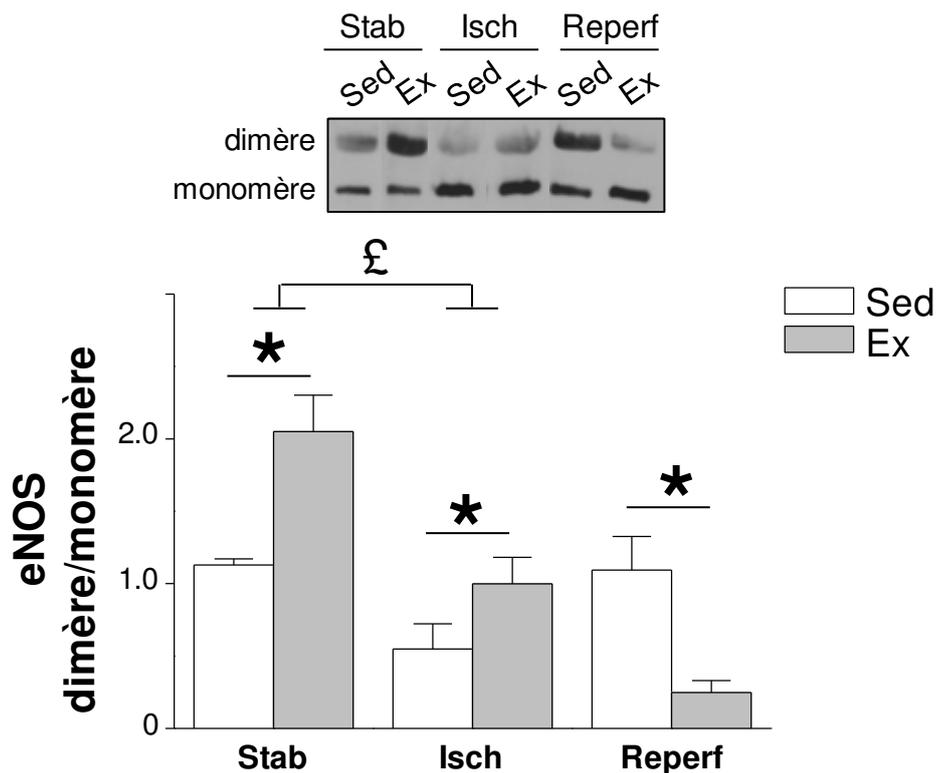


Figure III.17 : Evaluation par western blot du ratio dimère/monomère de eNOS à l'état basal (Stab), après 30 minutes d'ischémie (Isch) et après 10 minutes de reperfusion (Reperf). * p<0,05 Ex vs. Sed ; £ p<0,05 Stab vs. Isch.

III. Bilan de cette étude

Dans cette étude, nous avons tout d'abord confirmé l'efficacité de notre modèle d'entraînement chronique en endurance sur la sensibilité du cœur à l'IR. En accord avec les études menées sur les effets cardioprotecteurs de l'exercice (Powers *et al.*, 1998 ; Demirel *et al.*, 2001 ; Hamilton *et al.*, 2003 ; French *et al.*, 2006), notre modèle d'entraînement est associé à une augmentation de la capacité antioxydante cardiaque. Par ailleurs, nos résultats confirment le rôle majeur de la eNOS et de son activation dans la cardioprotection par l'exercice. En effet, en accord avec l'étude de Calvert *et al.* (2011), nous avons observé que l'exercice est responsable d'une augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177} myocardique, mais est également à l'origine d'une amélioration de l'état de couplage de la eNOS, puisqu'à la suite des 5 semaines d'entraînement le ratio dimère/monomère de eNOS est significativement augmenté dans les cœurs de rats Ex. Enfin, et ceci constitue un résultat majeur de cette étude, nous avons mis en évidence que la cardioprotection par l'exercice est associée à une diminution du niveau de eNOS-P^{Ser1177} et surtout à un important découplage de la eNOS myocardique au cours des premières minutes de reperfusion, alors que ces phénomènes ne sont pas observés chez la population de rats Sed.

Etude n° 3

**Rôle du découplage de la eNOS dans la
cardioprotection par l'exercice.**

I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs

Le découplage de la eNOS est reconnu dans de nombreuses pathologies comme un facteur délétère majeur, notamment à l'origine d'une amplification du stress nitro-oxydant, contribuant ainsi à l'aggravation des troubles biologiques observées dans ces pathologies (Moens, 2006 ; Carnicer *et al.*, 2012). En effet, le découplage de la eNOS est rapporté comme favorisant la réaction du NO avec l' O_2^- aboutissant ainsi à la formation de $ONOO^-$, un radical extrêmement cytotoxique notamment rapporté comme jouant un rôle majeur dans la gravité des lésions de reperfusion myocardique (Wang & Zweier, 1996 ; Yasmin *et al.*, 1997 ; Zweier *et al.*, 2001 ; Pacher *et al.*, 2007). De plus, l'oxydation du BH_4 en BH_2 par le $ONOO^-$ renforce le découplage de la eNOS induit par le stress oxydant de reperfusion, provoquant ainsi un cercle vicieux oxydatif de « *ROS-induced ROS release* » (Chen *et al.*, 2010). Ainsi, le recouplage de la eNOS, obtenu notamment par augmentation de la biodisponibilité du BH_4 , cofacteur essentiel au maintien de l'état dimérisé de la eNOS, a été rapporté dans de nombreuses études comme permettant de réduire la sensibilité du myocarde au syndrome d'IR (Verma *et al.*, 2002 ; Yamashiro *et al.*, 2002 ; Tiefenbacher *et al.*, 2003 ; Dumitrescu *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, nos résultats associant la cardioprotection par l'exercice à un découplage accru de la eNOS au moment de la reperfusion (étude n°2) semblent en contradiction avec la littérature scientifique. Dans cette troisième étude nous nous sommes donc intéressés au rôle de ce découplage fonctionnel de eNOS dans la cardioprotection par l'exercice. Est-il un simple dommage collatéral qui étant donné l'amélioration du statut antioxydant myocardique, peut ne pas avoir de conséquences majeures sur la fonction et la viabilité myocardique ? Ou peut-il être impliqué dans le phénomène de cardioprotection par l'exercice ?

II. Résultats

Pour répondre à ces questions, nous avons perfusé les cœurs des rats Sed et Ex avec du BH₄, soit au cours des 5 minutes précédant et succédant la période d'ischémie, soit uniquement lors des 5 premières minutes de reperfusion.

1. Effets de la perfusion de BH₄ sur le couplage de la eNOS

Afin de s'assurer de l'efficacité de la perfusion de BH₄ sur le couplage de la eNOS, nous avons évalué le ratio dimère/monomère de eNOS sur des homogénats de cœurs prélevés post-ischémie ou après 10 minutes de reperfusion, traités ou non avec du BH₄. L'administration de BH₄ a permis d'augmenter de manière considérable le rapport de dimère/monomère de eNOS chez les rats Ex au cours de l'ischémie (Fig. III.18 A), mais surtout, a permis de restaurer chez les rats Ex un niveau de eNOS couplée comparable à celui évalué chez les rats Sed à 10 minutes de reperfusion (Fig. III.18 B).

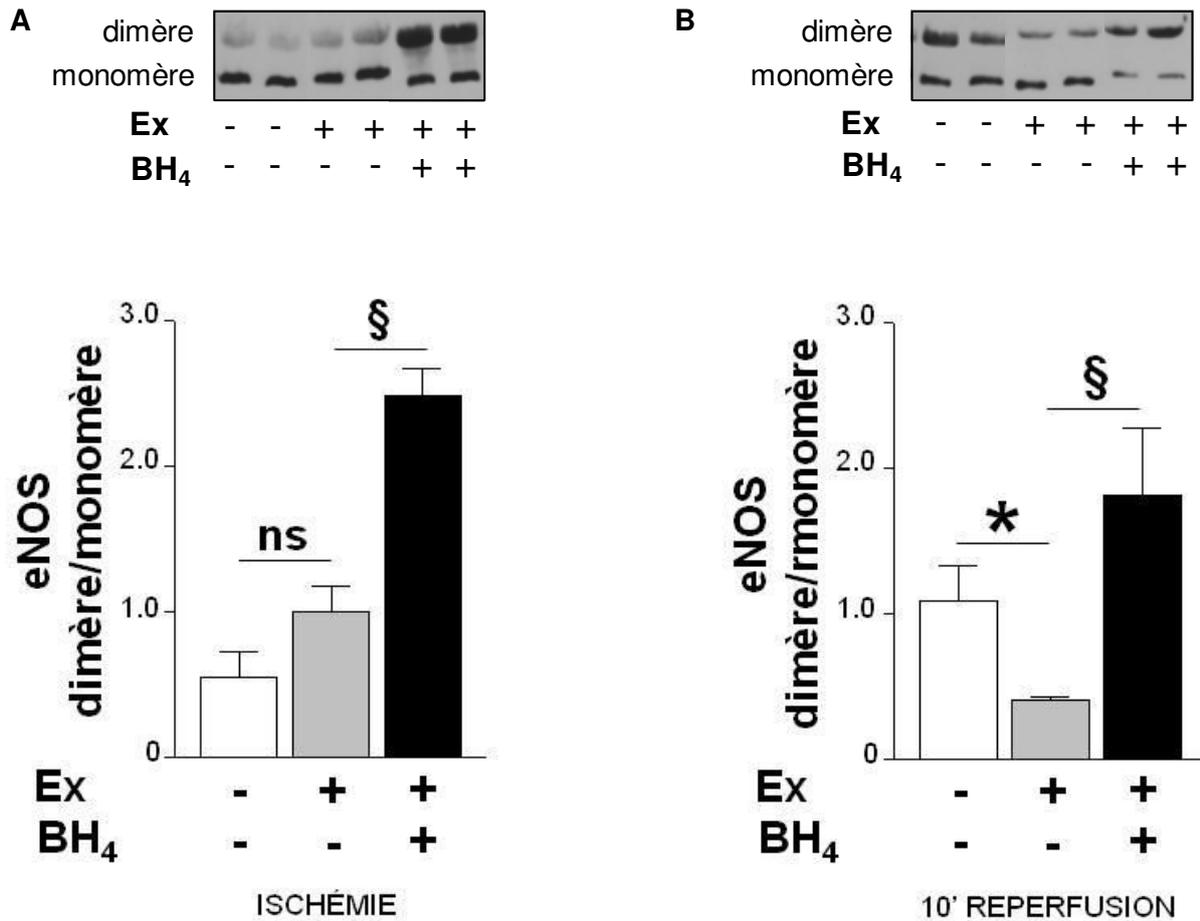


Figure III.18 : Evaluation par western blot du ratio dimère/monomère de eNOS chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ 5 minutes avant et après la période d'ischémie. **A** : Valeurs obtenues après 30 minutes d'ischémie ; **B** : Valeurs obtenues après 10 minutes de reperfusion. ns : non significatif ; * p<0,05 Ex vs. Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH₄.

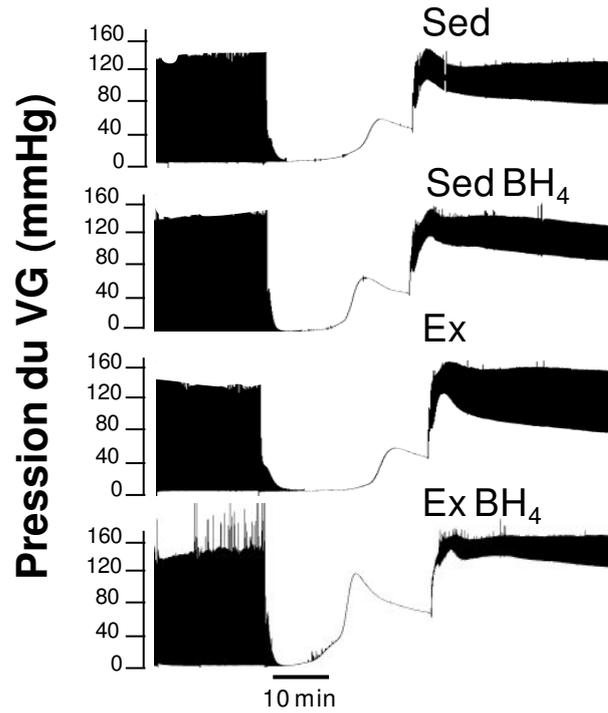
2. Implication du découplage de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice

2.1. La fonction myocardique

Un résultat majeur de ce travail de thèse est que lorsque la eNOS est recouplée pharmacologiquement par l'administration de BH₄, les effets bénéfiques de l'exercice sur la récupération fonctionnelle post-ischémie sont totalement inhibés, alors qu'aucun effet du BH₄

n'est observé chez la population sédentaire. En effet, la récupération fonctionnelle de la contractilité myocardique, caractérisée par les variations de P_{dev} (Fig. III.19) et de dP/dt_{max} (Tableau III.3) au cours de la reperfusion, est très largement diminuée chez les rats Ex+BH₄ lorsque comparés aux rats Ex, et plus aucune différence n'est observée lorsque comparés aux animaux Sed (Fig. III.19). L'administration de BH₄ est également associée à une perte des effets protecteurs de l'exercice sur la relaxation myocardique lors des premières minutes de reperfusion, puisqu' aucune différence de récupération de la dP/dt_{min} n'est observée entre les rats Ex+BH₄ et les rats Sed (Tableau III.3). Ces résultats indiquent donc que le découplage de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion semble être un élément essentiel dans l'amélioration de la récupération fonctionnelle post-ischémique avec l'exercice.

A



B

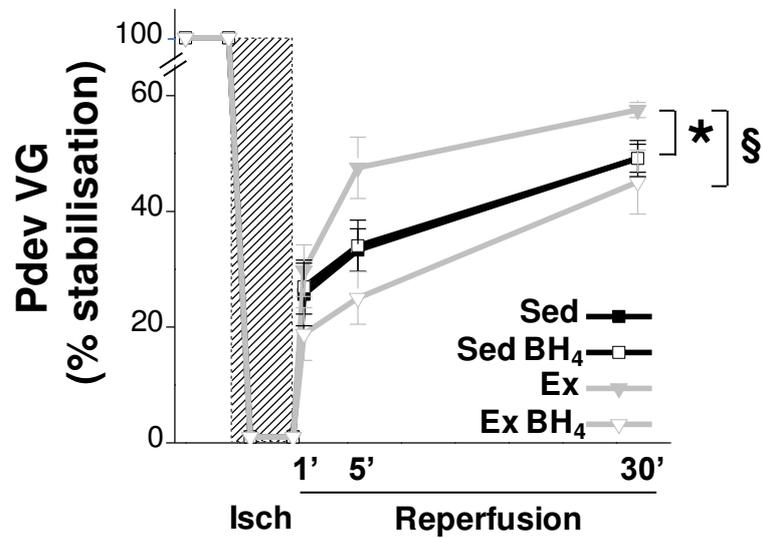


Figure III.19 : A : Représentation des tracés de pression du ventricule gauche au cours de l'IR. **B** : Pression développée par le ventricule gauche au cours du protocole d'IR chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ 5 minutes avant et après l'ischémie. * p<0,05 Ex vs.Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH₄.

Paramètres fonctionnels				
	dP/dt min (% stab)		dP/dt max (% stab)	
	5' reperf	30' reperf	5' reperf	30' reperf
Sed	24,28 ± 2,73	44,19 ± 3,01	22,61 ± 2,40	43,57 ± 2,86
Ex	37,40 ± 5,14 *	52,90 ± 2,06	34,06 ± 4,23 *	50,55 ± 1,04
Sed+BH ₄	26,03 ± 3,46	46,04 ± 3,18	25,32 ± 3,58	45,89 ± 3,05
Ex+BH ₄	19,69 ± 3,19 §	47,49 ± 2,10	18,01 ± 2,88 §	44,23 ± 2,35 §

Tableau III.3 : Evaluation des dérivées minimales (dP/dt min) et maximales (dP/dt max) de pression par rapport au temps après 5 et 30 minutes de reperfusion. Valeurs exprimées en pourcentage des valeurs de stabilisation. * p<0,05 Ex vs.Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH₄.

2.2. Débit coronarien

Aucun effet significatif de l'administration de BH₄ n'a été observé sur les variations de débit coronarien des rats Sed et Ex (Tableau III.4). Ce résultat suggère que le recouplage pharmacologique de la eNOS n'a pas d'effet sur la régulation du débit artériel coronarien.

	Débit coronarien (ml/min)			
	Stabilisation	5' reperf	10' reperf	30' reperf
Sed	13,18 ± 0,25	5,67 ± 0,35	6,60 ± 0,36	5,55 ± 0,41
Ex	13,31 ± 0,50	5,20 ± 0,34	5,88 ± 0,41	5,20 ± 0,19
Sed+BH ₄	--	6,14 ± 0,56	6,58 ± 0,39	5,89 ± 0,37
Ex+BH ₄	--	5,95 ± 0,57	6,63 ± 0,56	5,64 ± 0,38

Tableau III.4 Débits coronariens au cours de la stabilisation et après 5, 10 et 30 minutes de reperfusion.

2.3. Taille de la zone infarctie

En accord avec les résultats obtenus sur la récupération fonctionnelle cardiaque, la perfusion de BH₄ chez les rats Ex est responsable d'une perte totale des effets bénéfiques de l'exercice sur la taille de la ZI, alors qu'aucun effet n'est observé chez les rats Sed.

Comme illustré dans la Fig. III.20, les rats Ex+BH₄ présentent une taille de ZI très nettement supérieure aux rats Ex, suggérant une sévère aggravation de la mort cellulaire chez les rats entraînés lorsque la eNOS est maintenue couplée au cours des premières minutes de reperfusion. De plus, il est intéressant de noter que ce maintien pharmacologique de l'état couplé de la eNOS chez les rats Ex est associé à une augmentation marquée de la taille de la ZI lorsque comparés aux rats Sed (Sed Ctrl = 35,76±1,77 vs. Ex+BH₄ = 44,23±1,98 ; p< 0,001).

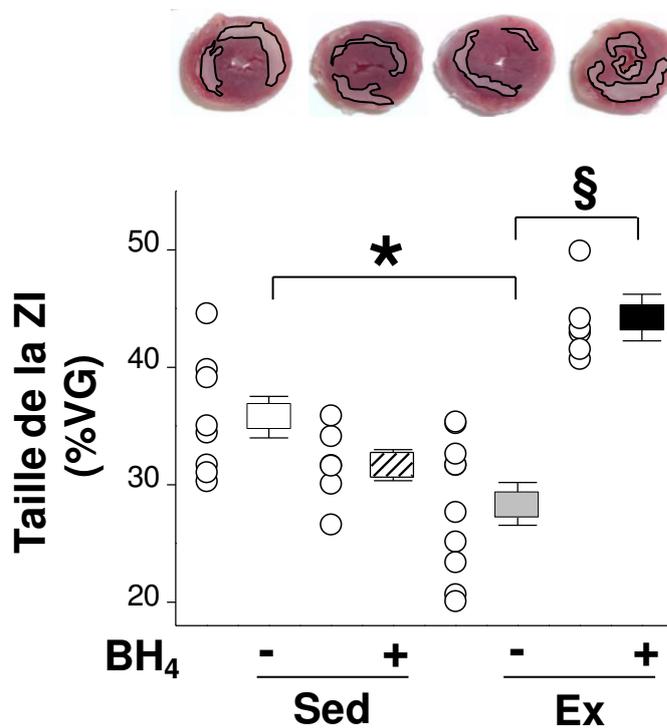


Figure III.20 : Taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ 5 minutes avant et après l'ischémie. * p<0,05 Ex vs.Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH₄.

2.4. Effets de la perfusion de BH₄ réalisée lors des 5 premières minutes de reperfusion sur la cardioprotection par l'exercice

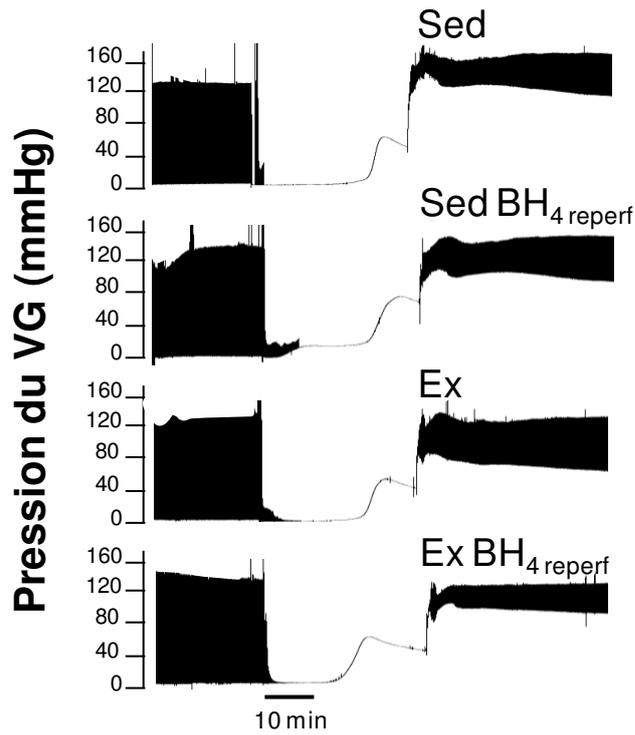
De manière inattendue, l'ensemble de ces résultats montrent clairement que le découplage de la eNOS au cours de l'IR est un élément nécessaire à la cardioprotection par

l'exercice, puisque son inhibition pharmacologique est associée à une perte des effets cardioprotecteurs. Néanmoins dans notre travail, la perfusion de BH₄ a permis d'induire une normalisation de l'état couplé de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion, mais est également à l'origine d'une importante augmentation du couplage de la eNOS au cours de l'ischémie lorsque comparé au niveau de dimérisation de la eNOS des cœurs de rats Sed. Afin de s'assurer que cet effet pharmacologique, observé au cours de l'ischémie, ne soit pas à l'origine de cette sensibilité accrue du myocarde de rats entraînés à l'IR, nous avons réalisé un second protocole d'IR avec une perfusion de BH₄ administrée uniquement lors des 5 premières minutes de reperfusion.

La perfusion de BH₄ réalisée en début de reperfusion est responsable d'une perte totale des effets bénéfiques de l'exercice sur la récupération fonctionnelle post-ischémie. En effet, on observe une perte des effets protecteurs de l'exercice sur la récupération de la Pdev au cours de la reperfusion chez les rats Ex+BH₄ _{reperf} comparés aux rats Ex. Par ailleurs, aucun effet de cette stratégie de perfusion du BH₄ n'est observé chez le groupe sédentaire (Fig. III.21 A&B).

Ces résultats fonctionnels sont confirmés par l'évaluation de la taille de la ZI. En effet, l'administration de BH₄ est responsable d'une abolition complète de l'effet cardioprotecteur de l'exercice sur la mort cellulaire puisque les rats Ex+BH₄ _{reperf} présentent une taille de ZI significativement plus importante que celle mesurée sur les cœurs de rats Ex, et plus aucune différence n'apparaît lorsque comparés aux rats Sed (Fig. III.22).

A



B

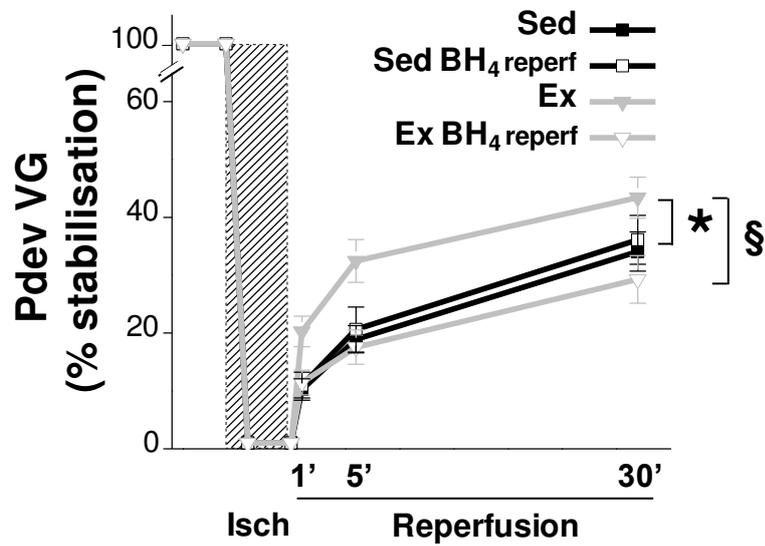


Figure III.21 : A : Représentation des tracés de pression du ventricule gauche au cours de l'IR. **B :** Pression développée par le ventricule gauche au cours du protocole d'IR chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ lors des 5 premières minutes de reperfusion. * p<0,05 Ex vs.Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH₄ reperf.

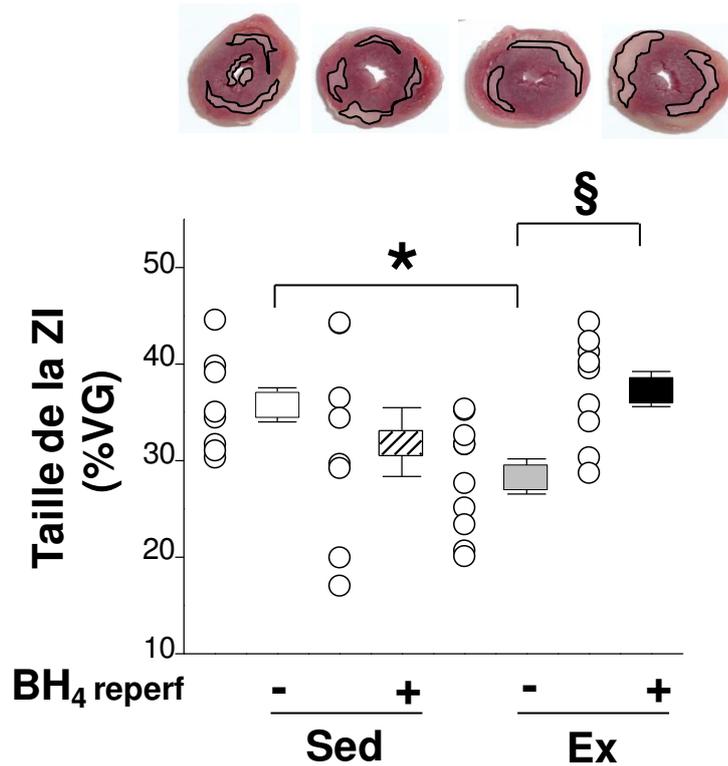


Figure III.22 : Représentation de la taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ lors des 5 premières minutes de reperfusion. * p<0,05 Ex vs.Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH₄reperf.

Ces résultats indiquent donc clairement que le découplage de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion constitue un élément essentiel de la cardioprotection par l'exercice, puisque celle-ci est abolie lorsque la eNOS est maintenue couplée pharmacologiquement.

Face à l'ensemble de ces résultats inattendus, nous avons dans un second temps essayé de mieux comprendre le rôle joué par ce découplage au cours des premières minutes de reperfusion dans la cardioprotection induite par l'exercice.

Compte tenu du rôle de la eNOS dans la synthèse de NO lorsque celle-ci est couplée, et d'O₂⁻ lorsqu'elle est découplée, nous avons évalué les modifications de productions de RLO et de NO par la eNOS, ainsi que de formation de ONOO⁻, produit dérivé de leur réaction, au cours premières minutes de reperfusion.

3. Productions de NO et d'O₂⁻ par la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion

3.1. Production de NO

La production de NO a été mesurée indirectement par l'évaluation de la quantité de nitrites et nitrates au niveau des effluents coronaires. La mesure de ces dérivés nitrés a été réalisée à l'aide d'un kit de dosage basé sur la transformation du NO en nitrites et nitrates, reflétant donc ici la quantité de NO produit par le muscle cardiaque. Il est par ailleurs intéressant de noter que Calvert *et al.* (2011) ont mis en évidence que la cardioprotection par l'exercice impliquait une augmentation des stocks de métabolites du NO (nitrites et nitrosothiols) permettant ainsi la libération de NO indépendamment de l'activité enzymatique des NOS. Dans notre étude, afin de distinguer la production de NO dépendante des NOS au cours de la reperfusion de celle pouvant être liée aux métabolites du NO, la production de NO dans les effluents coronaires a été évaluée en présence ou non de L-NAME. Les résultats sont présentés dans la Fig.III.23.

De manière cohérente avec le découplage de la eNOS observé chez les rats Ex au cours des premières minutes de reperfusion, nous observons une moindre quantité de NO produit chez les rats Ex comparés aux rats Sed sur cette période. En effet, le découplage de la eNOS est largement rapporté comme responsable d'une réduction de la synthèse de NO, au profit d'une production d' $O_2^{\cdot-}$ (Xia, 2007). De plus, un résultat extrêmement intéressant est que l'administration de L-NAME est associée à une réduction de la production de NO chez les rats Sed, alors qu'aucun effet n'est observé chez les rats Ex. Ces résultats suggèrent donc qu'en début de reperfusion, la production de NO chez les rats Ex est essentiellement indépendante de la eNOS.

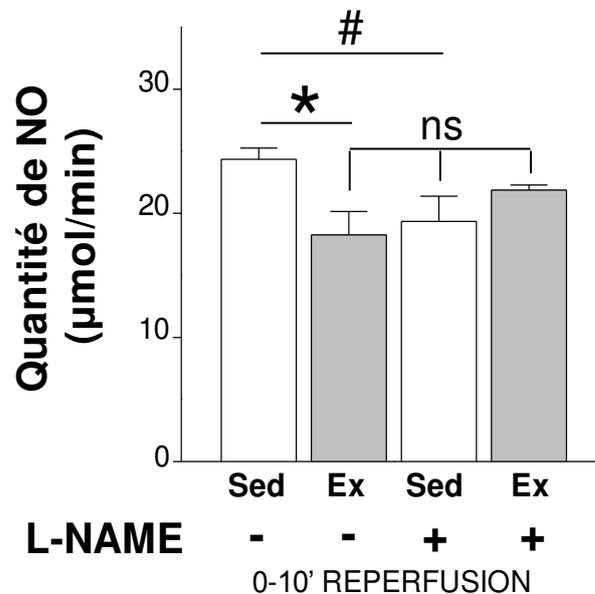


Figure III.23 : Production de NO évaluée dans les effluents coronaires recueillis lors des 10 premières minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec de la L-NAME 5 minutes avant et après l'ischémie. ns : non significatif ; * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; # $p < 0,05$ Sed vs. Sed+L-NAME.

3.2. Production d' $O_2^{\cdot-}$ dépendante de la NOS

L'évaluation de la synthèse d' $O_2^{\cdot-}$ a été réalisée par RPE sur des homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion. Afin d'évaluer la production d' $O_2^{\cdot-}$ dépendante des NOS, la production d' $O_2^{\cdot-}$ dans l'homogénat a été mesurée en présence ou non de L-NAME.

Les résultats présentés Fig. III.24 sont donc le résultat de la différence entre ces deux mesures, représentant ainsi la production d' $O_2^{\cdot-}$ par les NOS myocardiques. Le découplage de la eNOS observé chez les rats Ex à 10 minutes de reperfusion est associé à une augmentation de la capacité de synthèse d' $O_2^{\cdot-}$ dépendante des NOS lorsque comparés aux rats Sed.

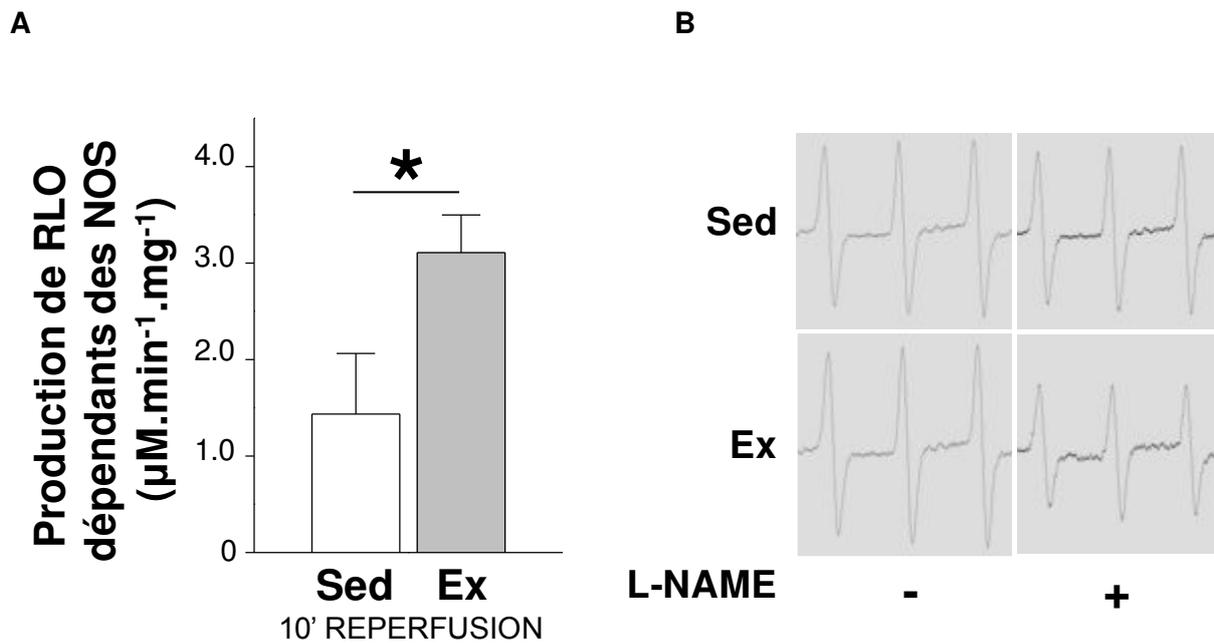


Figure III.24 : **A** : Production de RLO dépendante des NOS évaluée par RPE sur des homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex ; **B** : Représentations des spectres RPE de détection d' $O_2^{\cdot-}$ d' homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex en présence ou non de L-NAME. * $p < 0,05$ Ex vs.Sed.

Ces résultats, mettant en évidence une diminution de la production de NO et une augmentation de la synthèse de RLO dépendante des NOS au cours des premières minutes de reperfusion, viennent ici confirmer le découplage de la eNOS mesuré par western blot.

4. Effets de l'exercice sur le stress nitro-oxydant au cours des premières minutes de reperfusion

Dans ce travail, il semble donc que la cardioprotection soit associée à un découplage de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion, et ainsi à une capacité accrue de synthèse d'O₂⁻ par les NOS et une moindre production de NO. Très récemment, une étude de l'équipe de Zweier, publiée dans *Nature* (Chen *et al.*, 2010) puis commentée peu de temps après par cette même équipe dans la revue *Antioxidant Redox Signaling* (Zweier *et al.*, 2011), suggère pour la première fois que le découplage temporaire de la eNOS pourrait, en condition pro-oxydante, constituer une adaptation bénéfique permettant de limiter la production de NO au profit de celle d'O₂⁻, afin de prévenir la formation de ONOO⁻. Dans notre travail, nous nous sommes alors intéressés à évaluer si la moindre production de NO dépendante des NOS, associée à l'amélioration de la capacité myocardique des rats Ex à piéger les RLO, pouvait contribuer à réduire le stress nitro-oxydant au cours de la reperfusion.

4.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

Un résultat important de cette étude est que, en dépit de la production accrue de RLO par les NOS, l'exercice est à l'origine d'une réduction de la peroxydation lipidique au cours des premières minutes de reperfusion, mise en évidence par une moindre quantité de MDA dans les cœurs de rats Ex lorsque comparés aux cœurs de rats Sed (Fig. III.25). Ce résultat met ainsi en évidence que, en dépit du découplage fonctionnel de la eNOS au cours de la reperfusion post-ischémie, l'exercice est à l'origine d'une diminution des dommages cellulaires résultant d'un stress nitro-oxydant.

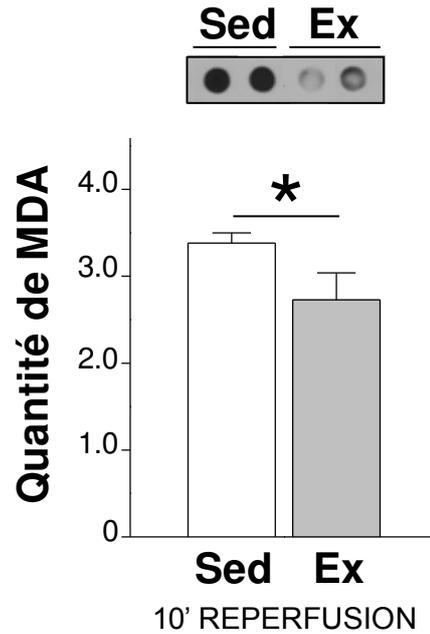


Figure III.25 : Quantité de MDA évaluée sur des homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex. ns : non significatif ; * $p < 0,05$ Ex vs.Sed.

4.2. Evaluation de la nitrotyrosination myocardique

Dans cette étude, la moindre production de NO dépendante des NOS et la meilleure capacité à piéger l' O_2^- sont associées à une réduction de la nitrotyrosination protéique au cours des premières minutes de reperfusion dans les cœurs de rats Ex comparés à ceux des rats Sed (Fig. III.26). Ce résultat majeur semble indiquer que la diminution de synthèse de NO induite par le découplage de la eNOS chez les rats Ex puisse contribuer à réduire la réaction entre le NO et l' O_2^- et ainsi limiter la formation de $ONOO^-$. Etant donné la reconnaissance du rôle majeur du $ONOO^-$ dans la sévérité des lésions de reperfusion, ce résultat constitue un élément important dans la compréhension du rôle du découplage de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice.

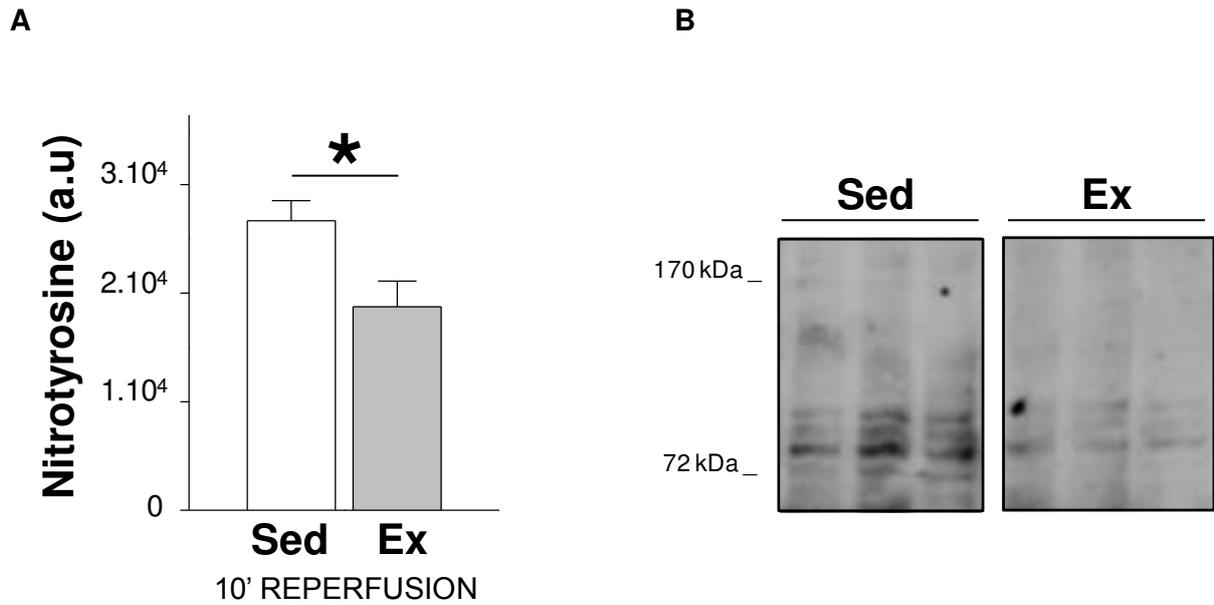


Figure III.26 : **A** : Evaluation par western blot de la nitrotyrosination protéique de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex ; **B** : Représentation de la nitrotyrosination protéique évaluée par western blot sur un gel polyacrylamide-SDS permettant la détection des protéines de 72 à 170 kDa . * $p < 0,05$ Ex vs.Sed.

III. Bilan de cette étude

Le découplage de la eNOS est classiquement rapporté dans la littérature comme un phénomène délétère associé à l'aggravation des lésions pathologiques (Moens, 2006 ; Carnicer *et al.*, 2012). Divers études ont en effet décrit une réduction de la sensibilité du myocarde à l'IR avec une administration de BH₄, cofacteur essentiel au maintien de l'état couplé de la eNOS (Verma *et al.*, 2002 ; Tiefenbacher *et al.*, 2003 ; Dumitrescu *et al.*, 2007). Dès lors, l'observation dans notre travail d'une aggravation du découplage de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion chez les rats Ex constitue un résultat inattendu. L'objectif de cette 3^{ème} étude était donc de tenter de mieux comprendre le rôle joué par le découplage de la eNOS dans la cardioprotection induite par l'exercice. Un résultat majeur de ces travaux est que ce phénomène est essentiel à la cardioprotection par l'exercice. En effet, nous avons montré que la normalisation pharmacologique de l'état couplé de la eNOS lors des premières minutes de reperfusion avait pour conséquence une abolition totale de la cardioprotection induite par l'exercice. Le rôle du découplage de la eNOS dans ce type de cardioprotection semble pouvoir être expliqué dans notre travail par une moindre formation de ONOO⁻, résultant de la diminution de la synthèse de NO et de l'amélioration des capacités de défenses antioxydantes.

Etude n° 4

**Rôle de la phosphorylation
catécholaminergique-dépendante de la
eNOS sur la sensibilité du myocarde à
l'ischémie-reperfusion.**

I. Contexte scientifique de l'étude et objectifs

Les résultats de nos études précédentes ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice. Dans des conditions comparables, Calvert *et al.* (2011) ont démontré que cette cardioprotection était dépendante d'une augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177} induite par la stimulation catécholaminergique des récepteurs β_3 -AR. Dans cette nouvelle étude, afin d'apprécier le rôle joué par l'augmentation du statut antioxydant et son interaction avec les modulations de la eNOS au cours de l'IR, nous avons évalué si l'augmentation catécholaminergique-dépendante du niveau de eNOS-P^{Ser1177} pouvait permettre à elle seule de simuler le phénomène de cardioprotection par l'exercice. D'autre part, de manière intéressante Chen *et al.* (2008) émettent dans leurs travaux l'hypothèse que l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} pourrait favoriser le découplage de la eNOS en condition de stress. Ainsi nous avons également évalué si l'augmentation du niveau de phosphorylation de la eNOS pouvait contribuer à expliquer son découplage au cours des premières minutes de reperfusion. Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé chez des rats contrôles, donc sédentaires, une injection d'épinéphrine (EPI) afin d'augmenter pharmacologiquement le niveau de eNOS-P^{Ser1177} (Figuroa *et al.*, 2009 ; Calvert *et al.*, 2011).

II. Résultats

1. Effets de l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} sur la sensibilité du myocarde à l'IR

1.1. Effet de l'injection d'EPI sur la eNOS-P^{Ser1177}

Dans un premier temps nous avons vérifié l'efficacité de notre protocole d'injection d'EPI sur la phosphorylation du résidu Ser¹¹⁷⁷ de la eNOS. Pour cela, après que les rats aient reçu l'administration d'un bolus d'EPI en intraveineuse (10 µg.kg⁻¹), les cœurs ont été prélevés, perfusés 10 minutes sur un poste de cœur isolé de Langendorff et congelés. Les résultats sont présentés dans la Fig. III.27. L'injection d'EPI a permis d'augmenter de manière significative le niveau de eNOS-P^{Ser1177}, sans induire de modification de l'expression de l'enzyme.

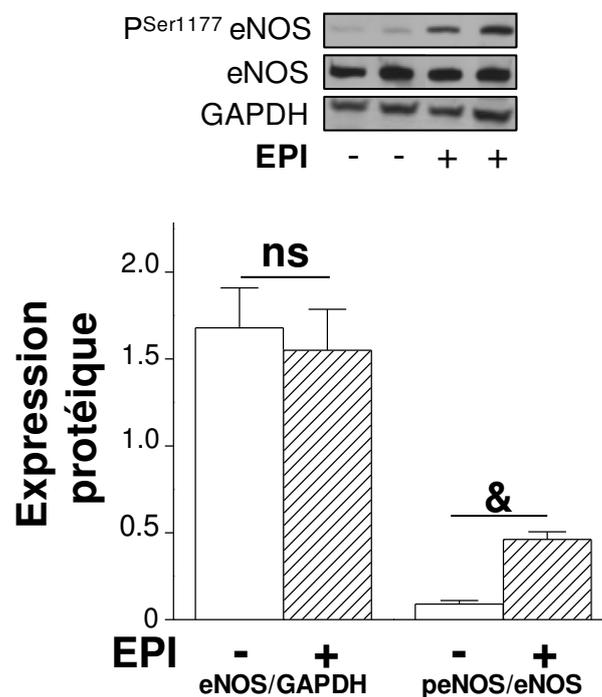


Figure III.27 : Evaluation par western blot de l'effet de l'injection d'EPI sur l'expression myocardique de la eNOS et sur la phosphorylation de la eNOS sur la Ser¹¹⁷⁷ chez des rats sédentaires. ns : non significatif ; & p<0,05 EPI vs. Ctrl.

1.2. Phosphorylation pharmacologique de eNOS et sensibilité du cœur à l'IR

Afin d'évaluer les effets de la phosphorylation pharmacologique de la eNOS-P^{Ser1177} sur la sensibilité du myocarde à l'IR, un protocole d'IR semblable aux études n°2 et 3 a été réalisé et la taille de la ZI a été évaluée après 2 heures de reperfusion. Les résultats montrent que l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} à l'état basal, par une stimulation catécholaminergique comparable à la signalisation cellulaire induite par la condition d'exercice (Calvert *et al.*, 2011), est à l'origine d'une cardioprotection chez les rats sédentaires. En effet, la taille de la ZI est sensiblement réduite chez les rats traités à l'EPI lorsque comparés aux rats sédentaires non traités (Fig. III.28).

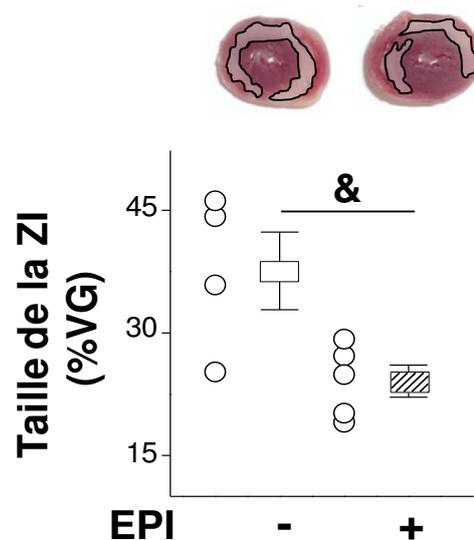


Figure III.28 : Taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats sédentaires ayant reçu ou non une administration d'EPI. & $p < 0,05$ EPI vs. Ctrl.

2. Régulation post-transcriptionnelle de la eNOS au cours de la reperfusion : impact de l'augmentation pharmacologique de eNOS-P^{Ser1177}

L'induction de cardioprotection par phosphorylation catécholaminergique de la eNOS au niveau de la Ser¹¹⁷⁷ est en accord avec les études rapportant l'importance de la voie β_3 -AR-eNOS (Aragon *et al.*, 2011) ou du niveau de eNOS-P^{Ser1177} dans la modulation de la sensibilité du cœur à l'IR (Keyes *et al.*, 2010). Afin de déterminer si les mécanismes de cardioprotection impliqués dans cette voie sont comparables à ceux que nous avons observés avec l'exercice, nous nous sommes ensuite intéressés à évaluer les modulations du niveau de eNOS-P^{Ser1177} ainsi que de l'état de couplage de cette enzyme au cours des premières minutes de reperfusion chez la population EPI. Les résultats montrent qu'après 10 minutes de reperfusion post-ischémique les rats EPI présentent un niveau de eNOS-P^{Ser1177} sensiblement supérieur à celui mesuré chez des rats Sed non traités (Fig. III.29), tandis que chez les rats Ex celui-ci était clairement diminué (Fig. III.16). De plus, aucun effet de traitement préalable à l'EPI n'est rapporté sur le ratio dimère/monomère de eNOS à 10 minutes de reperfusion (Fig. III.30).

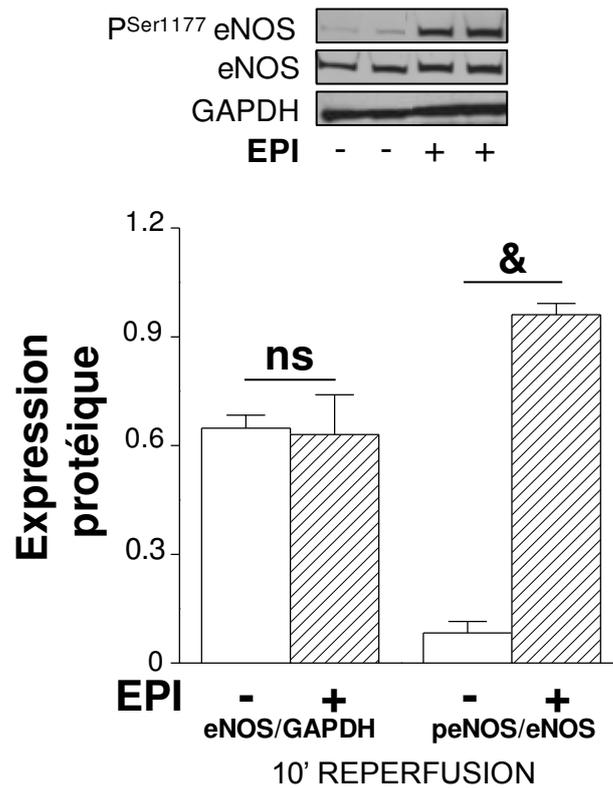


Figure III.29 : Evaluation par western blot de l'effet de l'injection d'EPI sur l'expression et la phosphorylation (Ser¹¹⁷⁷) de eNOS à 10 minutes de reperfusion chez des rats sédentaires. ns : non significatif ; & p<0,05 EPI vs. Ctrl.

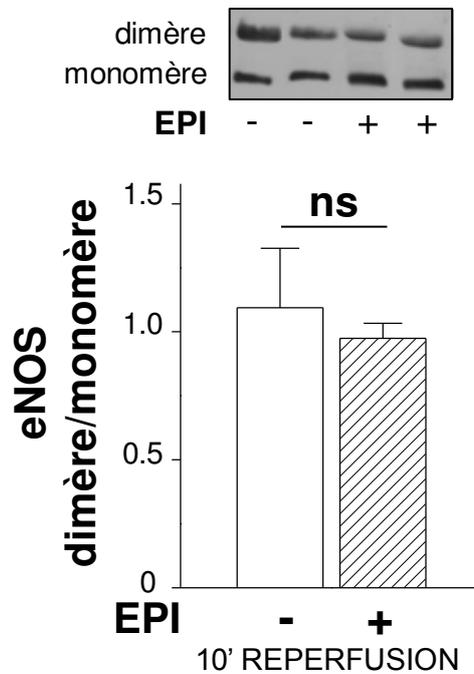


Figure III.30 : Evaluation par western blot de l'effet l'injection d'EPI sur le ratio de dimère/monomère de eNOS chez des rats sédentaires à 10 minutes de reperfusion. ns : non significatif.

III. Bilan de cette étude

Les objectifs de cette dernière étude étaient i) d'évaluer le rôle de l'interaction entre l'augmentation du statut enzymatique antioxydant et l'augmentation catécholaminergique du niveau de eNOS-P^{Ser1177} dans l'induction d'un phénotype cardioprotecteur et ii) d'évaluer si cet état phosphorylé de eNOS pouvait influencer sur l'état de couplage de la eNOS au cours de l'IR. En accord avec les travaux de Aragon *et al.* (2010) nous avons montré que l'augmentation pharmacologique de eNOS-P^{Ser1177} était à l'origine d'une diminution de la sensibilité du myocarde à l'IR. Néanmoins, un résultat très intéressant est que les mécanismes de cardioprotection impliqués dans cette cardioprotection diffèrent de ceux observés avec l'exercice, puisque le niveau de phosphorylation de eNOS, ainsi que son état couplé, ne sont pas altérés au cours des premières minutes de reperfusion lorsque comparés à leur niveau avant l'ischémie. En effet, tandis que la cardioprotection des rats Ex se caractérise par une nette diminution de la eNOS-P^{Ser1177} et par une aggravation du découplage de l'enzyme au cours des premières minutes de reperfusion, les rats EPI présentent eux un maintien de l'état phosphorylé de la eNOS, sans effet sur son découplage. Cette étude permet donc de mettre en évidence la complexité de la cardioprotection par l'exercice, impliquant certainement plusieurs facteurs, telles que notamment une modulation spécifique de la eNOS au cours de l'IR et une augmentation du statut enzymatique antioxydant myocardique.

Discussion

I. Prévention par l'exercice du développement d'un phénotype pathologique : rôle dans la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets préventifs de la pratique d'exercice en endurance sur le remodelage pathologique cardiomyocytaire, tel que rencontré dans un modèle d'exposition prolongée au CO. En effet, l'exposition à ce polluant urbain avait préalablement été rapportée, dans le laboratoire où j'ai réalisé mes travaux de doctorat, comme responsable d'un remodelage phénotypique cardiomyocytaire à l'origine d'une aggravation de la vulnérabilité du cœur à l'IR (Meyer *et al.*, 2010). Les résultats majeurs de cette étude sont que la pratique régulière d'exercice, réalisée préalablement puis maintenue au cours de l'exposition au CO, permet i) de prévenir les altérations cardiomyocytaires induites par ce modèle et ainsi ii) de normaliser la sensibilité du cœur à l'IR.

L'exposition chronique à de faibles concentrations de CO telles que rencontrées en milieu urbain a été montrée comme étant responsable d'une altération de l'homéostasie calcique intracellulaire, associée à une réduction de la contractilité cardiomyocytaire (Bye *et al.*, 2008 ; André *et al.*, 2010). En effet, Bye *et al.* (2008) et André *et al.* (2010) ont notamment mis en évidence une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ en diastole, expliquée par une altération des cinétiques de re-séquestration du Ca^{2+} au sein du RS. Les effets de cette exposition prolongée sur l'expression cardiomyocytaire de SERCA-2a (André *et al.*, 2010), ou sur l'état d'activation de cette pompe du RS (Bye *et al.*, 2008) semblent pouvoir, en partie au moins, expliquer ce phénomène. Dans ce travail, nous avons montré que l'exercice en endurance réalisé avant et maintenu pendant l'exposition au CO permettait de prévenir les effets délétères induits par notre modèle d'exposition au CO sur l'homéostasie calcique cellulaire. En effet, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ diastolique observée chez les rats CO est totalement prévenue chez les rats entraînés, permettant ainsi de normaliser l'amplitude du

transitoire calcique. Ces effets bénéfiques de l'exercice semblent pouvoir être expliqués dans notre étude par une préservation du niveau d'expression des pompes SERCA-2a chez les rats CO entraînés, permettant ainsi de normaliser les cinétiques de re-séquestration du Ca^{2+} dans le RS. Ces résultats sont en accord avec divers études rapportant dans le cadre de pathologies myocardiques les effets bénéfiques de l'exercice sur l'expression de SERCA-2a, à l'origine d'une restauration ou d'une amélioration des mouvements calciques au cours du CEC (Wisloff *et al.*, 2002 ; French *et al.*, 2006 ; Stolen *et al.*, 2009). Par ailleurs, il semblerait que le stress oxydant, lié notamment aux effets délétères de l'exposition prolongée au CO sur le statut enzymatique antioxydant (André *et al.*, 2010 ; Meyer *et al.*, 2010) et sur la chaîne mitochondriale de transfert des électrons (André *et al.*, 2011), puisse participer à la compréhension des effets délétères de l'exposition au CO sur l'homéostasie calcique. En effet, il a été rapporté que les effets délétères de l'exposition au CO, notamment sur les mouvements calciques au cours d'un stress, pouvaient être prévenus par l'utilisation d'antioxydants non spécifiques (André *et al.*, 2011). La pratique régulière d'exercice est largement rapportée comme étant bénéfique pour le système cardiovasculaire, notamment grâce à l'augmentation des capacités de défenses antioxydantes myocardiques (Powers *et al.*, 1998 ; French *et al.*, 2006 ; Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). Dans ce travail nous avons également observé que l'altération du statut enzymatique antioxydant chez les animaux exposés au CO, caractérisée par une diminution d'activités de la SOD et de la GPx, était prévenue par un entraînement préalable. Dès lors, il semble que les effets bénéfiques de l'exercice sur le statut antioxydant cellulaire, à l'origine d'une normalisation de l'activité des enzymes SOD et GPx, puisse en grande partie contribuer à expliquer les effets bénéfiques de l'exercice sur la préservation de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire. Néanmoins, nous ne pouvons ignorer l'implication possible d'effets bénéfiques directs de l'exercice sur les protéines de l'homéostasie calcique (Wisloff *et al.*, 2001 ; 2002 ; Kemi *et al.*, 2007 ; 2008 ; Stolen *et al.*, 2009).

Ce remodelage cellulaire lié à l'exposition au CO a par ailleurs été rapporté comme étant impliqué dans la plus grande sensibilité du cœur à un stress aigu, physiologique (André *et al.*, 2011) ou pathologique, telle que l'IR (Meyer *et al.*, 2010). En effet, Meyer *et al.* (2010) ont rapporté, au cours d'une anoxie-réoxygénation, une aggravation de la surcharge calcique diastolique sur des cardiomyocytes issus de rats exposés au CO par rapport à ceux de rats contrôles, permettant d'expliquer la sévérité accrue des lésions de reperfusion post-ischémique. De plus, André *et al.* (2011) ont rapporté qu'un stress physiologique (hyperstimulation), était à l'origine d'une surcharge calcique diastolique conduisant à l'apparition de transitoires calciques ectopiques. Ce phénomène, semblerait pouvoir expliquer, dans cette étude, le potentiel pro-arythmique des cœurs de rats exposés au CO. Dans ces deux études, l'utilisation de NAC (N-acétyl cystéine), un antioxydant non spécifique, permettait de prévenir la surcharge calcique et ainsi de réduire/normaliser la sensibilité du cœur au stress. Il est dès lors intéressant de noter que dans notre travail, les effets protecteurs de l'exercice sur i) le statut enzymatique antioxydant et ii) l'altération des mouvements calciques intracellulaires et notamment la surcharge calcique diastolique, sont associés à une normalisation de la sensibilité du cœur au syndrome d'IR, caractérisée par une diminution de la sévérité des arythmies de reperfusion et de la mort cellulaire. Dans notre travail, il semble donc que la préservation des capacités enzymatiques antioxydantes cardiaque chez les rats CO entraînés, mais aussi la restauration des mouvements calciques à l'état basal, puissent expliquer les effets cardioprotecteurs de l'exercice.

Dans cette première étude, nous avons mis en évidence que la pratique régulière d'exercice en endurance permet, *via* i) son effet bénéfique sur le statut enzymatique antioxydant et ii) son effet sur la régulation des mouvements calciques au cours du CEC, de prévenir le développement d'un phénotype pathologique cardiomyocytaire sensible à l'IR.

II. Rôle de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice

Après s'être intéressés à l'exercice en tant que stratégie permettant de prévenir l'établissement d'un phénotype sensible à l'IR, dans cette seconde partie de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de la eNOS dans cette cardioprotection par l'exercice. La eNOS est une cible reconnue de l'exercice (Sessa *et al.*, 1994 ; Hambrecht *et al.*, 2003 ; Lauer *et al.*, 2005) et constitue un élément clef de modulation de la sensibilité du cœur à l'IR (Brunner *et al.*, 2003; Elrod *et al.*, 2006 ; Frantz *et al.*, 2009). Étonnamment, à ce jour, seule une étude s'est intéressée à son implication dans la cardioprotection par l'exercice (Calvert *et al.*, 2011). Ces auteurs ont mis en évidence que l'augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177} induite par l'exercice était à l'origine d'une hausse des métabolites du NO, impliquée dans la cardioprotection par l'exercice. Néanmoins, comment l'exercice affecte l'activation de la eNOS au cours de l'IR, et contribue ainsi à protéger le myocarde, reste à ce jour inconnu. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à évaluer les effets de l'exercice sur la modulation de l'état d'activation de la eNOS lors des phases d'ischémie et de reperfusion, en portant un intérêt particulier sur les modifications de phosphorylation et de dimérisation de cette enzyme. Ces travaux nous ont permis i) de confirmer le rôle clef de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice, et ii) de mettre en évidence, contre toute attente, le rôle requis du découplage de la eNOS lors des premières minutes de reperfusion dans cette stratégie de cardioprotection.

En accord avec de nombreuses études (Hambrecht *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2009 ; Calvert *et al.*, 2011), notre modèle d'entraînement est à l'origine d'une augmentation du niveau de phosphorylation de la eNOS sur son résidu Ser¹¹⁷⁷, sans modification d'expression de l'enzyme. De manière intéressante nous avons aussi observé une augmentation du couplage de la eNOS avec l'exercice. Dans une étude réalisée sur les effets de l'exercice sur la eNOS chez une population de rats diabétiques (rats Goto-Kakizaki), dont l'état de

couplage de la eNOS est altéré, Grijavla *et al.* (2008) avaient observé une normalisation du couplage de la eNOS avec l'entraînement. A notre connaissance, nous sommes néanmoins les premiers à avoir montré un tel résultat sur une population de rats sains. Afin de tenter d'expliquer ce résultat, nous nous sommes alors intéressés aux effets de l'exercice sur l'expression de l'enzyme GCH-1, reconnue comme étant l'enzyme limitante dans la synthèse de BH₄. L'absence d'effet de l'exercice sur l'expression de GCH-1 ne nous permet pas d'expliquer cette augmentation de l'état couplé de la eNOS. Au niveau aortique, Widder *et al.* (2007) ont rapporté une augmentation du contenu cellulaire en BH₄ en réponse au stress de cisaillement *via* une stimulation de l'activité de la GCH-1 par sa phosphorylation au niveau de son résidu Ser⁸¹, sans modification d'expression de l'enzyme. Il semble alors envisageable qu'un tel mécanisme de régulation de l'activité de GCH-1 puisse contribuer à expliquer l'augmentation du couplage de la eNOS chez les rats Ex. Cette hypothèse reste néanmoins à investiguer.

L'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} est rapportée dans la littérature comme permettant de réduire la sensibilité du myocarde à l'IR (Kupatt *et al.*, 2004 ; Aragon *et al.*, 2011), et plus particulièrement a été démontrée par Calvert *et al.* (2011) comme impliquée dans la cardioprotection par l'exercice. En accord avec cette dernière étude, nous avons confirmé que l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} chez la population de rats Ex est associée à une diminution marquée de la sensibilité du myocarde à l'IR. De plus, un résultat intéressant de ce travail est qu'en présence de L-NAME la cardioprotection observée chez les rats Ex est abolie. Bien que cet inhibiteur ne soit pas spécifique de la eNOS, l'absence d'effet significatif de la L-NAME chez la population sédentaire d'une part, et surtout l'absence d'effet de l'exercice sur les expressions de nNOS et iNOS d'autre part, suggèrent fortement que la eNOS joue un rôle non négligeable dans la cardioprotection par l'exercice. Calvert *et al.* (2011) ont préalablement rapporté que la cardioprotection par l'exercice pouvait être expliquée par l'augmentation des stocks de métabolites du NO (nitrites, nitrosothiols) liée à l'augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177}. En effet, ces auteurs ont observé, en utilisant un

modèle de souris β_3 -AR^{-/-}, qu'en absence de phosphorylation catécholaminergique de la eNOS au niveau de son résidu Ser¹¹⁷⁷, l'absence d'augmentation des stocks de métabolites du NO conduisait à une perte totale des effets cardioprotecteurs de l'exercice. Néanmoins, ces auteurs n'abordent à aucun moment le rôle que pourrait jouer cette modulation d'activité de la eNOS au cours de l'IR. Dans notre travail, l'utilisation de L-NAME, dans les 5 minutes précédant l'ischémie et au cours des 5 premières minutes de reperfusion, suggère fortement un rôle de la eNOS au cours de l'IR dans cette cardioprotection. De manière à mieux comprendre comment cette eNOS contribue à la protection du myocarde par l'exercice, il semblait important de s'intéresser aux effets de l'exercice sur la modulation de l'état fonctionnel de la eNOS au cours de l'IR.

Un premier résultat majeur de ce travail est que l'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} induite par l'exercice est associée à un découplage significatif de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion post-ischémique. Etant donné le rôle délétère du découplage de la eNOS sur la sévérité des lésions de reperfusion (Carnicer *et al.*, 2012), et compte tenu de la reconnaissance de l'exercice comme stratégie de cardioprotection efficace (Ascencao *et al.*, 2007 ; Powers *et al.*, 2008), ce résultat était inattendu. Au cours de l'ischémie, le découplage de la eNOS a été observé dans de mêmes proportions chez les populations de rats Sed et Ex. Ce résultat est cohérent avec la mise en évidence d'une déplétion du contenu cellulaire en BH₄ au cours de l'ischémie (Dumitrescu *et al.*, 2007). Cependant, alors qu'au moment de la reperfusion, la eNOS myocardique est recouplée chez les rats Sed à un niveau comparable à celui observé avant l'ischémie, dans les cœurs de rats Ex la reperfusion est associée à une aggravation du découplage de l'enzyme. De manière intéressante, Chen *et al.* (2008) ont préalablement évoqué dans leurs travaux que la phosphorylation de la eNOS au niveau de son résidu Ser¹¹⁷⁷ pourrait favoriser son découplage en situation pro-oxydante. Afin de tester cette hypothèse nous avons induit chez une population de rats sédentaires une rapide augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177} dépendante de la voie β -AR, par une administration intraveineuse d'EPI (Calvert *et al.*, 2011), afin de simuler l'action de l'exercice

sur l'enzyme, puis avons évalué son effet sur l'état de couplage de la eNOS après IR. L'augmentation pharmacologique de eNOS-P^{Ser1177} n'a eu aucun effet sur le ratio dimère/monomère de eNOS à 10 minutes de reperfusion. Ce résultat suggère donc que le découplage de la eNOS observé chez les rats Ex lors de la phase précoce de reperfusion ne semble pas pouvoir être expliqué par l'augmentation préalable de eNOS-P^{Ser1177}. Le contenu total en BH₄ et/ou le ratio BH₄/BH₂ sont connus comme étant des éléments essentiels au maintien de l'état dimérisé de la eNOS (Vasquez-Vivar *et al.*, 2002 ; Alp & Channon, 2004; Crabtree *et al.*, 2008 ; 2009). Il est par ailleurs intéressant de noter que la synthèse *de novo* de BH₄ à partir du BH₂ oxydé est assurée par la DHFR, et que l'inhibition pharmacologique ou par ARN interférant de cette enzyme conduit à une diminution du ratio BH₄/BH₂ et à un découplage de la eNOS (Crabtree *et al.*, 2011). Dès lors, il semblerait intéressant d'évaluer la participation du ratio BH₄/BH₂ et de la DHFR dans l'exacerbation du découplage de la eNOS au cours de l'IR. Ceci constitue une perspective de recherche intéressante afin de mieux appréhender ce phénomène inattendu.

D'autre part, nous avons également observé dans notre travail que la cardioprotection par l'exercice est associée à une nette réduction de eNOS-P^{Ser1177} au cours de l'IR. La phosphorylation de la eNOS sur son résidu Ser¹¹⁷⁷ par l'exercice est décrite comme dépendante de la stimulation β_3 -AR (Calvert *et al.*, 2011) et régulée par la voie de signalisation de Pi3K-Akt (Boo *et al.*, 2002 ; Balligand *et al.*, 2009 ; Barbosa *et al.*, 2012). Cette phosphorylation résulte d'un équilibre sensible entre son induction par la voie Pi3K-Akt et son inhibition par les phosphatases, à laquelle participent notamment PTEN et PP2A. Les effets de l'exercice sur ces phosphatases sont très peu documentés. Mieux comprendre la modulation de leur activité au cours de l'IR pourrait permettre de mieux comprendre la diminution du niveau de eNOS-P^{Ser1177} observée chez les rats Ex au cours de l'IR. Il est ainsi intéressant de noter, que l'oxydation et la dégradation de PTEN au cours des premières minutes de reperfusion, semblent pouvoir participer à l'augmentation de l'activité d'Akt lors de la reperfusion (Cai *et al.*, 2005). Ceci pourrait permettre d'expliquer dans notre étude la

restauration du niveau de eNOS-P^{Ser1177} à 10 minutes de reperfusion chez la population Sed. Dans notre modèle de rats exercés, l'amélioration de la capacité antioxydante myocardique associée à l'exercice, à l'origine d'une réduction du stress oxydant au cours de l'IR, pourrait alors limiter l'oxydation de PTEN et ainsi possiblement expliquer l'absence de restauration du niveau de eNOS-P^{Ser1177} chez les rats Ex. Mais ceci reste à ce jour une hypothèse à investiguer.

L'augmentation de eNOS-P^{Ser1177} préalable à l'IR, notamment par stimulation de la voie des récepteurs β_3 -AR, est à l'origine d'une diminution marquée de la sensibilité du cœur à l'IR (Aragon *et al.*, 2010). En accord avec cette étude, l'augmentation pharmacologique de eNOS-P^{Ser1177} par injection d'EPI chez des rats sédentaires a permis de réduire la sensibilité du myocarde à l'IR. Néanmoins, cette cardioprotection est associée à un maintien du niveau de eNOS-P^{Ser1177}, ainsi qu'à un maintien de l'état couplé de la eNOS à 10 minutes de reperfusion. L'effet bénéfique de ce traitement pharmacologique suggère donc que la cardioprotection associée à la réduction du couplage de eNOS et du niveau de eNOS-P^{Ser1177} est un mécanisme spécifique de l'exercice, indépendant de la seule activation catécholaminergique de eNOS.

Face à ces résultats non attendus nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer si le découplage de la eNOS, chez les rats Ex, pouvait jouer un rôle dans la cardioprotection par l'exercice ou était un simple dommage collatéral de reperfusion, sans conséquences majeures sur la vulnérabilité du cœur à l'IR. Pour cela une perfusion de BH₄ avant et/ou après ischémie a été réalisée. Un résultat majeur de ce travail est que le maintien pharmacologique de l'état couplé de la eNOS chez les rats Ex est à l'origine d'une abolition totale de la cardioprotection par l'exercice. Ces résultats indiquent clairement que le découplage de la eNOS, survenant spécifiquement lors des premières minutes de reperfusion, est un élément essentiel afin de permettre la cardioprotection par l'exercice.

Le découplage de la eNOS est admis comme étant responsable d'une réduction de la synthèse de NO au profit d'une augmentation de la synthèse d' $O_2^{\cdot-}$ (Xia, 2007). Dans notre étude, de manière cohérente avec la littérature, la diminution du ratio de dimère/monomère de eNOS chez les rats Ex est associée à une moindre production de NO et une augmentation de la synthèse d' $O_2^{\cdot-}$ dépendantes des NOS. Un résultat important de ce travail est que cette modification de la balance entre production d' $O_2^{\cdot-}$ et production de NO par les NOS n'est pas à l'origine d'une augmentation du stress oxydant chez les rats Ex. En effet, ce découplage de eNOS est associé à une moindre peroxydation lipidique à 10 minutes de reperfusion. Ce résultat peut notamment être expliqué par l'amélioration des capacités de défenses antioxydantes mesurées dans les cœurs de rats Ex. De plus, il est intéressant de noter que la phosphorylation de eNOS au niveau de la Ser¹¹⁷⁷, qui en situation physiologique de couplage de l'enzyme permet d'augmenter la synthèse de NO, est responsable d'une augmentation de la synthèse d' $O_2^{\cdot-}$ lorsque celle-ci est découplée (Chen *et al.*, 2008). Ainsi, la diminution de eNOS-P^{Ser1177} observée chez les rats Ex à 10 minutes de reperfusion pourrait permettre de limiter la synthèse de RLO par la eNOS et ainsi le stress oxydant cellulaire associé à ce découplage.

En situation pathologique pro-oxydante, le NO et l' $O_2^{\cdot-}$ réagissent ensemble pour former du ONOO⁻, dont la toxicité cellulaire et la participation aux lésions de reperfusion sont largement reconnues (Pacher *et al.*, 2007 ; Otani, 2009). De manière très intéressante, dans notre travail, le découplage de la eNOS chez la population de rats Ex est associée à une réduction de la nitrotyrosination protéique à 10 minutes de reperfusion, suggérant une moindre formation de ONOO⁻ dans les cœurs de cette population. Etant donné le rôle déterminant de la synthèse de ONOO⁻ en début de reperfusion post-ischémique dans la sévérité des lésions d'IR (Wang *et al.*, 1996 ; Yasmin *et al.*, 1997 ; Zweier *et al.*, 2001), ce résultat constitue un élément essentiel permettant une meilleure compréhension du rôle joué par le découplage de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice. En effet, la réduction

de la synthèse de NO par la eNOS, associée à l'amélioration des capacités du cœur à piéger les RLO, permettrait de prévenir la réaction entre le NO et l' $O_2^{\cdot -}$ et ainsi la formation de ONOO $^{\cdot -}$. Récemment, une telle hypothèse avait été formulée par Zweier *et al.* (2011), après qu'ils aient mis en évidence un découplage fonctionnel de la eNOS lors de l'augmentation cellulaire de la quantité de glutathion oxydé (Chen *et al.*, 2010). Par ailleurs, en accord avec nos résultats, il est intéressant de noter qu'il a été rapporté, dans le cadre de préconditionnement ischémique ou hypoxique permettant de réduire la sensibilité du myocarde à l'IR, une réduction de la synthèse de NO au cours de la phase précoce de reperfusion (Csonka *et al.*, 1999 ; Ryou *et al.*, 2008). Enfin, de manière intéressante, nous avons observé que dans notre modèle de cardioprotection par l'exercice, la production de NO au cours des premières minutes de reperfusion dans les cœurs de rats Ex était principalement indépendante de l'activité catalytique des NOS. Ce résultat suggère fortement l'implication d'autres sources de NO chez les rats entraînés. En effet, Calvert *et al.* (2011) ont démontré que la cardioprotection par l'exercice est dépendante de la présence de réserves endogène de métabolites du NO (nitrites et nitrosothiols) liée à l'augmentation du niveau de eNOS-P^{Ser1177} par l'exercice. Nous pouvons donc postuler que cette synthèse de NO indépendante des NOS pourrait permettre, en dépit du découplage de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion, de maintenir une biodisponibilité en NO suffisante pour permettre un bon fonctionnement myocardique et une cardioprotection.

L'ensemble de ces résultats a donc permis de mettre en évidence le rôle majeur du découplage de la eNOS lors des premières minutes de reperfusion dans la cardioprotection par l'exercice. En effet, ce découplage, associé à l'amélioration des capacités antioxydantes myocardiques, permettrait de limiter la réaction entre le NO et l' $O_2^{\cdot -}$ expliquant ainsi la réduction du stress nitro-oxydant au cours de la reperfusion post-ischémique.

III. Conclusion

Le travail réalisé au cours de ce doctorat a permis de mieux appréhender les mécanismes biologiques impliqués dans la cardioprotection par l'exercice. En effet, bien que l'exercice fasse parti des recommandations de l'OMS en termes de santé cardiovasculaire, et que les effets bénéfiques d'une pratique physique régulière en endurance sur la sensibilité du cœur à un accident ischémique soient largement reconnus, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette cardioprotection et leur potentiel thérapeutique restent peu investigués.

Ainsi dans un premier temps nous avons mis en évidence le rôle préventif d'une pratique régulière d'exercice en endurance sur le développement d'un remodelage cardiaque conduisant à une plus grande sensibilité du cœur aux stress, notamment ischémique. Cette prévention du remodelage cardiomyocytaire a ainsi permis, dans notre travail, de prévenir l'aggravation de la vulnérabilité du myocarde à l'ischémie-reperfusion. De plus, l'évaluation des cibles cellulaires impliquées dans cette cardioprotection préventive a permis d'affirmer le rôle clef des effets bénéfiques de l'exercice sur la régulation des mouvements calciques intracellulaires et le statut enzymatique antioxydant. Bien que ces résultats nécessitent d'être confirmés *in-vivo* et cliniquement, ils offrent une nouvelle approche thérapeutique intéressante, puisque naturelle et non coûteuse, dans la limitation des lésions liées à un infarctus du myocarde chez des populations potentiellement à risque.

Dans la seconde partie du travail de doctorat, nous avons mis en évidence l'implication de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice, et avons surtout révélé le rôle essentiel de son découplage au cours de la phase précoce de reperfusion post-ischémie dans cette stratégie thérapeutique. En effet, alors que le découplage de la eNOS est couramment rapporté comme responsable de l'aggravation des lésions de reperfusion (Carnicer *et al.*, 2012), nous avons démontré chez une population de rats entraînés en endurance, dont les réserves endogènes en métabolites du NO sont augmentées suite à l'activation de la eNOS par phosphorylation (Calvert *et al.*, 2011), et dont le statut antioxydant myocardique est

amélioré, que le découplage de la eNOS en début de reperfusion permet de limiter la formation de ONOO^- et ainsi de réduire le stress nitro-oxydant de reperfusion. Les mécanismes responsables d'une telle régulation de la eNOS au cours de l'IR apparaissent être complexes et spécifiques à l'exercice, ne pouvant être simulés par une simple augmentation du niveau de eNOS- $\text{P}^{\text{Ser1177}}$. Bien que les mécanismes cellulaires à l'origine de ce découplage restent aujourd'hui à investiguer, ce travail fournit une nouvelle approche sur le rôle complexe de la voie de synthèse du NO par la eNOS dans la santé cardiovasculaire, et ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans la compréhension de la stratégie de cardioprotection encore trop peu connue qu'est l'exercice.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence la complexité de la cardioprotection par l'exercice qui apparaît résulter d'une interaction complexe entre les effets bénéfiques de l'exercice sur notamment i) les protéines régulatrices des mouvements calciques intracellulaires, ii) l'amélioration du statut antioxydant cardiaque et iii) la modulation complexe de l'activité de la eNOS, impliquant une activation de celle-ci avant le stress ischémique responsable d'une augmentation des réserves endogènes en métabolites du NO, ainsi que son découplage et sa déphosphorylation au cours de l'IR permettant de limiter la synthèse de NO en condition pro-oxydante (Fig. IV.1). Etant donné l'efficacité de cette stratégie cardioprotectrice, comprendre les mécanismes impliqués pourrait représenter un intérêt pour le développement de méthodes thérapeutiques cardiaques. Néanmoins, la complexité de l'interaction entre de nombreuses cibles cellulaires dans la cardioprotection par l'exercice semble rendre une simulation pharmacologique de ce modèle peu envisageable. Ce travail de thèse aura néanmoins permis de mettre en avant le rôle clef de l'amélioration des défenses antioxydantes et de son interaction avec son environnement cellulaire (protéines régulatrices de l'homéostasie calcique, production d' O_2^- par la eNOS) dans la cardioprotection, et permet de mieux appréhender le rôle complexe de la voie de

synthèse du NO par la eNOS dans la modulation de la vulnérabilité du cœur au syndrome d'ischémie-reperfusion.

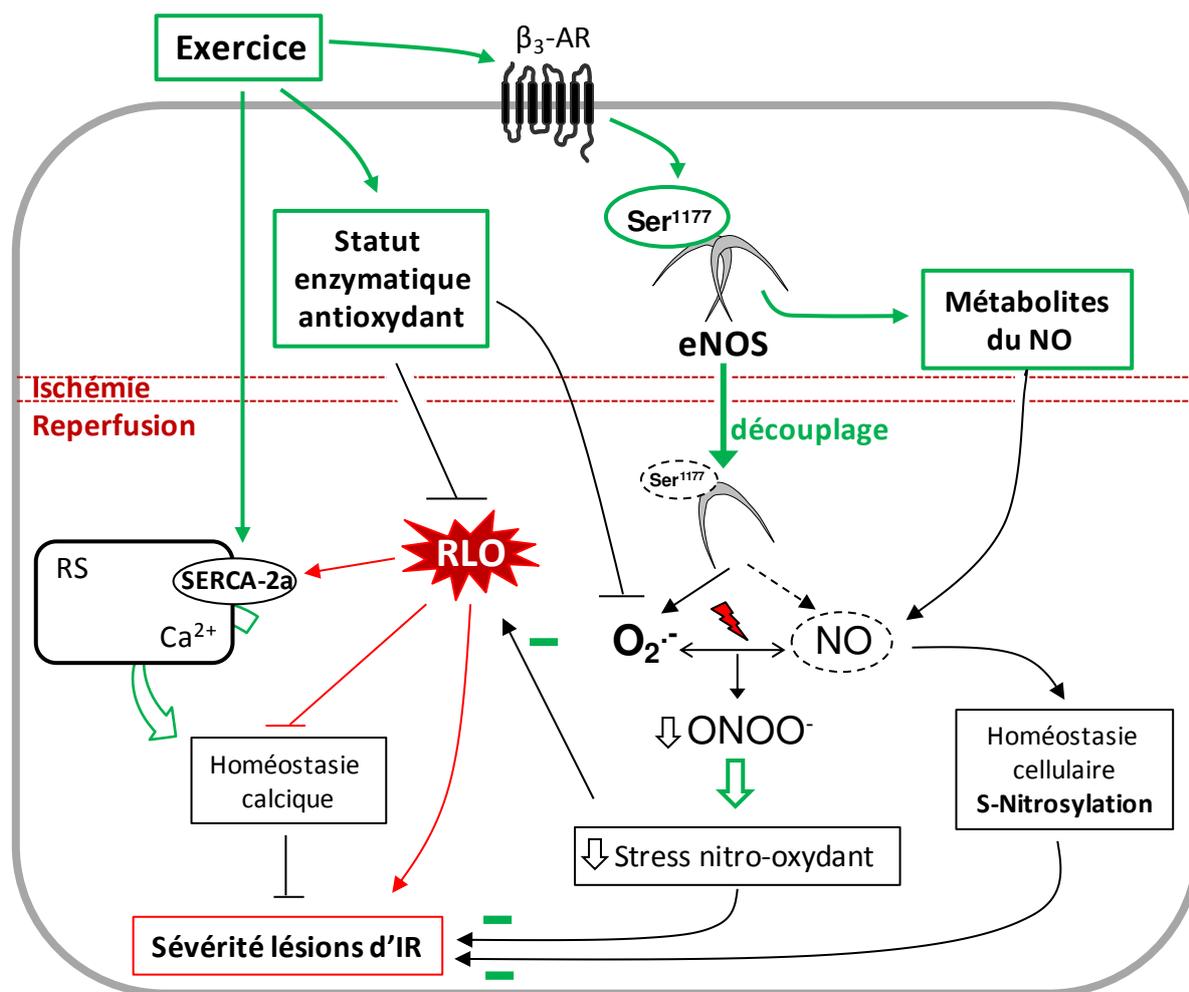


Figure IV.1 : Mécanismes de cardioprotection par l'exercice sur le syndrome d'ischémie-reperfusion.

β_3 -AR : récepteur β_3 -adrénergique ; eNOS : nitrique oxyde synthétase endothéliale ; SERCA-2a : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ; Ca^{2+} : calcium ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; $O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde ; NO : monoxyde d'azote ; $ONOO^-$: peroxynitrite.

Perspectives

Un résultat majeur de ce travail de thèse est la mise en évidence de la nécessité du découplage de la eNOS au cours des premières minutes de reperfusion post-ischémique dans la cardioprotection par l'exercice. La normalisation du couplage de l'enzyme avec l'administration pharmacologique de BH₄ dans notre étude suggère que ce mécanisme de découplage de la eNOS au cours de la phase précoce de reperfusion chez la population entraînée peut être expliquée, en partie au moins, par une modification dans la voie de synthèse et/ou de recyclage de ce cofacteur. En effet, il est rapporté que le découplage de la eNOS peut être induit par un manque de biodisponibilité de la quantité de BH₄ et/ou par une diminution du ratio BH₄/BH₂, pouvant provenir d'une altération du recyclage de BH₂ en BH₄, respectivement régulés par les enzymes GCH1 et DHFR (Vasquez-Vivar *et al.*, 2002 ; Crabtree *et al.*, 2009 ; 2011). Il serait ainsi intéressant d'évaluer chez les cœurs de rats Ex les quantités cardiomyocytaires de ces bioprotéines, par HPLC et détection électrochimique. De plus, alors que la régulation de l'activité de la DHFR reste encore peu documentée, l'activité de la GCH-1 apparaît être régulée par son niveau de phosphorylation sur son résidu Ser⁸¹, dépendante de la *casein kinase 2* (CK2) (Widder *et al.*, 2007). Ainsi, l'évaluation de la modulation des niveaux d'activités de ces enzymes au cours de l'IR constituent une perspective intéressante pour la compréhension du découplage de la eNOS observée chez les rats Ex.

D'autre part, nos résultats ont permis de mettre en évidence que la cardioprotection par l'exercice était également associée à une diminution du niveau de eNOS-P^{Ser1177} au moment de la reperfusion post-ischémique. La phosphorylation du résidu Ser¹¹⁷⁷ de la eNOS résulte de l'équilibre entre son induction par la voie Pi3K-Akt et son inhibition par les protéines phosphatases PP2A et PTEN. Il semble donc intéressant dans ce travail d'évaluer les effets de l'exercice sur les niveaux d'activités de ces phosphatases lors des premières minutes de reperfusion. Il est à noter que la phosphorylation de PTEN par la CK2 est responsable de son inhibition et donc de l'activation de la voie Pi3K/Akt (Al-Khoury *et al.*, 2005). Dès lors, il

pourrait être intéressant d'évaluer les effets de l'exercice sur l'activité de la CK2 au cours de la reperfusion post-ischémique.

Par ailleurs, telle que nous l'avons rapportée dans la première étude, la préservation des mouvements calciques intracellulaires constitue un élément clef de la cardioprotection par l'exercice (Wisloff *et al.*, 2002 ; French *et al.*, 2006 ; 2008). Dans l'étude n°3, nous avons mis en évidence que la cardioprotection chez les rats Ex était associée à une réduction de la formation de ONOO⁻ au cours des premières minutes de reperfusion. Etant donné les effets délétères reconnus du stress nitro-oxydant sur les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique, notamment à l'origine d'une fuite de Ca²⁺ par le RyR (André *et al.*, 2011) et d'une inhibition des pompes SERCA-2a (Lokuta *et al.*, 2005), il semblerait intéressant par la suite d'évaluer l'influence du découplage de la eNOS et de son recouplage pharmacologique sur la nitrotyrosination des différentes protéines régulatrices de l'homéostasie calcique.

Enfin, dans notre travail, nous postulons que la moindre synthèse de NO par la NOS permettrait de limiter la synthèse de ONOO⁻, et ce potentiellement en limitant la colocalisation subcellulaire des productions de NO et d'O₂⁻. Néanmoins les réserves endogènes de métabolites du NO chez les rats Ex (Calvert *et al.*, 2011) pourraient favoriser le maintien d'une biodisponibilité suffisante en NO, possiblement compartimentalisée, nécessaire au bon fonctionnement cardiomyocytaire. Afin de tester cette hypothèse, l'évaluation par microscopie à fluorescence des productions subcellulaires de NO et d'O₂⁻ semble pouvoir constituer une perspective intéressante dans la compréhension de ce mécanisme de cardioprotection.

Bibliographie

- Achan, V., Broadhead, M., Malaki, M., Whitley, G., Leiper, J., MacAllister, R. & Vallance, P. 2003.** Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1455-9.
- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M. & Pogwizd, S. M. 2005.** Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res*, 97, 1314-22.
- Ait Mou, Y., Reboul, C., Andre, L., Lacampagne, A. & Cazorla, O. 2009.** Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res*, 81, 555-64.
- Akita, Y., Otani, H., Matsuhisa, S., Kyoji, S., Enoki, C., Hattori, R., Imamura, H., Kamihata, H., Kimura, Y. & Iwasaka, T. 2007.** Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H2051-9.
- Al-Khouri, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S. & Mustelin, T. 2005.** Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem*, 280, 35195-202.
- Allen, D. G. & Orchard, C. H. 1987.** Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res*, 60, 153-68.
- An, J., Du, J., Wei, N., Xu, H., Pritchard, K. A., Jr. & Shi, Y. 2009.** Role of tetrahydrobiopterin in resistance to myocardial ischemia in Brown Norway and Dahl S rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, H1783-91.
- André, L., Boissiere, J., Reboul, C., Perrier, R., Zalvidea, S., Meyer, G., Thireau, J., Tanguy, S., Bideaux, P., Hayot, M., Boucher, F., Obert, P., Cazorla, O. & Richard, S. 2010.** Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 181, 587-95.
- André, L., Gouzi, F., Thireau, J., Meyer, G., Boissiere, J., Delage, M., Abdellaoui, A., Feillet-Coudray, C., Fouret, G., Cristol, J. P., Lacampagne, A., Obert, P., Reboul, C., Fauconnier, J., Hayot, M., Richard, S., *et al.* 2011.** Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Res Cardiol*, 106, 1235-46.
- Aragon, J. P., Condit, M. E., Bhushan, S., Predmore, B. L., Patel, S. S., Grinsfelder, D. B., Gundewar, S., Jha, S., Calvert, J. W., Barouch, L. A., Lavu, M., Wright, H. M. & Lefer, D. J. 2011.** Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *J Am Coll Cardiol*, 58, 2683-91.
- Ascensao, A., Magalhaes, J., Soares, J. M., Ferreira, R., Neuparth, M. J., Marques, F., Oliveira, P. J. & Duarte, J. A. 2006.** Endurance training limits the functional alterations of rat heart mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation. *Int J Cardiol*, 109, 169-78.
- Ascensao, A., Ferreira, R. & Magalhaes, J. 2007.** Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol*, 117, 16-30.

- Balligand, J. L., Feron, O. & Dessy, C. 2009.** eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev*, 89, 481-534.
- Barbosa, V. A., Luciano, T. F., Marques, S. O., Vitto, M. F., Souza, D. R., Silva, L. A., Santos, J. P., Moreira, J. C., Dal-Pizzol, F., Lira, F. S., Pinho, R. A. & De Souza, C. T. 2012.** Acute exercise induce endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via Akt and AMP-activated protein kinase in aorta of rats: Role of reactive oxygen species. *Int J Cardiol*.
- Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Hobai, I. A., Lemmon, C. A., Burnett, A. L., O'Rourke, B., Rodriguez, E. R., Huang, P. L., Lima, J. A., Berkowitz, D. E. & Hare, J. M. 2002.** Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*, 416, 337-9.
- Beckman, K. B. & Ames, B. N. 1998.** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 78, 547-81.
- Beers, R. F., Jr. & Sizer, I. W. 1952.** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*, 195, 133-40.
- Bell, M. L., Peng, R. D., Dominici, F. & Samet, J. M. 2009.** Emergency hospital admissions for cardiovascular diseases and ambient levels of carbon monoxide: results for 126 United States urban counties, 1999-2005. *Circulation*, 120, 949-55.
- Bendall, J. K., Alp, N. J., Warrick, N., Cai, S., Adlam, D., Rockett, K., Yokoyama, M., Kawashima, S. & Channon, K. M. 2005.** Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res*, 97, 864-71.
- Bernardi, P. 1999.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79, 1127-55.
- Bersohn, M. M. & Scheuer, J. 1977.** Effects of physical training on end-diastolic volume and myocardial performance of isolated rat hearts. *Circ Res*, 40, 510-6.
- Bertuglia, S. 2008.** Intermittent hypoxia modulates nitric oxide-dependent vasodilation and capillary perfusion during ischemia-reperfusion-induced damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H1914-22.
- Bolli, R. & Marban, E. 1999.** Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*, 79, 609-34.
- Bolli, R. 2001.** Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 1897-918.
- Boo, Y. C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J. & Jo, H. 2002.** Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem*, 277, 3388-96.

- Borutaite, V., Morkuniene, R. & Brown, G. C. 1999.** Release of cytochrome c from heart mitochondria is induced by high Ca²⁺ and peroxynitrite and is responsible for Ca(2+)-induced inhibition of substrate oxidation. *Biochim Biophys Acta*, 1453, 41-8.
- Borutaite, V., Jekabsone, A., Morkuniene, R. & Brown, G. C. 2003.** Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 357-66.
- Boutbir, J., Charles, A. L., Echaniz-Laguna, A., Kindo, M., Daussin, F., Auwerx, J., Piquard, F., Geny, B. & Zoll, J. 2012.** Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J*, 33, 1397-407.
- Brandes, R. P., Weissmann, N. & Schroder, K. 2010.** NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 49, 687-706.
- Braunwald, E. & Kloner, R. A. 1982.** The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66, 1146-9.
- Braunwald, E. 2011.** Clinical efforts to reduce myocardial infarct size--the next step. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 16, 349-53.
- Brown, G. C. 1995.** Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, 369, 136-9.
- Brown, G. C. & Borutaite, V. 2002.** Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*, 33, 1440-50.
- Brown, D. A., Chicco, A. J., Jew, K. N., Johnson, M. S., Lynch, J. M., Watson, P. A. & Moore, R. L. 2005.** Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol*, 569, 913-24.
- Brown, G. C. & Borutaite, V. 2007.** Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc Res*, 75, 283-90.
- Brunner, F., Maier, R., Andrew, P., Wolkart, G., Zechner, R. & Mayer, B. 2003.** Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*, 57, 55-62.
- Burnett, R. T., Cakmak, S., Brook, J. R. & Krewski, D. 1997.** The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect*, 105, 614-20.
- Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M., Tompkins, A. J., Young, S. & Brookes, P. S. 2006.** Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem J*, 394, 627-34.
- Butler, M. J., Chan, W., Taylor, A. J., Dart, A. M. & Duffy, S. J. 2011.** Management of the no-reflow phenomenon. *Pharmacol Ther*, 132, 72-85.

- Bye, A., Sorhaug, S., Ceci, M., Hoydal, M. A., Stolen, T., Heinrich, G., Tjonna, A. E., Najjar, S. M., Nilsen, O. G., Catalucci, D., Grimaldi, S., Contu, R., Steinshamn, S., Condorelli, G., Smith, G. L., Ellingsen, O., et al. 2008.** Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol*, 20, 635-46.
- Cadenas, E. & Davies, K. J. 2000.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29, 222-30.
- Cai, Z. & Semenza, G. L. 2005.** PTEN activity is modulated during ischemia and reperfusion: involvement in the induction and decay of preconditioning. *Circ Res*, 97, 1351-9.
- Calvert, J. W., Condit, M. E., Aragon, J. P., Nicholson, C. K., Moody, B. F., Hood, R. L., Sindler, A. L., Gundewar, S., Seals, D. R., Barouch, L. A. & Lefer, D. J. 2011.** Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res*, 108, 1448-58.
- Carnicer, R., Crabtree, M. J., Sivakumaran, V., Casadei, B. & Kass, D. A. 2012a.** Nitric Oxide Synthases in Heart Failure. *Antioxid Redox Signal*.
- Chambers, D. E., Parks, D. A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J. M., Yoshida, S., Parmley, L. F. & Downey, J. M. 1985.** Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 17, 145-52.
- Chen, Y., Traverse, J. H., Du, R., Hou, M. & Bache, R. J. 2002.** Nitric oxide modulates myocardial oxygen consumption in the failing heart. *Circulation*, 106, 273-9.
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. 2003.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*, 278, 36027-31.
- Chen, Q., Camara, A. K., Stowe, D. F., Hoppel, C. L. & Lesnefsky, E. J. 2007.** Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C137-47.
- Chen, C. A., Druhan, L. J., Varadharaj, S., Chen, Y. R. & Zweier, J. L. 2008.** Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem*, 283, 27038-47.
- Chen, C. A., Wang, T. Y., Varadharaj, S., Reyes, L. A., Hemann, C., Talukder, M. A., Chen, Y. R., Druhan, L. J. & Zweier, J. L. 2010a.** S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature*, 468, 1115-8.
- Chen, W., Druhan, L. J., Chen, C. A., Hemann, C., Chen, Y. R., Berka, V., Tsai, A. L. & Zweier, J. L. 2010b.** Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. *Biochemistry*, 49, 3129-37.
- Chiong, M., Wang, Z. V., Pedrozo, Z., Cao, D. J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J. A. & Lavandero, S. 2011.** Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis*, 2, e244.

- Cohen, M. V., Yang, X. M. & Downey, J. M. 2006.** Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies. *Cardiovasc Res*, 70, 231-9.
- Cohen, M. V., Yang, X. M., Liu, Y., Solenkova, N. V. & Downey, J. M. 2010.** Cardioprotective PKG-independent NO signaling at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H2028-36.
- Corr, P. B. & Witkowski, F. X. 1983.** Potential electrophysiologic mechanisms responsible for dysrhythmias associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation*, 68, 116-24.
- Crabtree, M. J., Smith, C. L., Lam, G., Goligorsky, M. S. & Gross, S. S. 2008.** Ratio of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin to 7,8-dihydrobiopterin in endothelial cells determines glucose-elicited changes in NO vs. superoxide production by eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H1530-40.
- Crabtree, M. J., Tatham, A. L., Al-Wakeel, Y., Warrick, N., Hale, A. B., Cai, S., Channon, K. M. & Alp, N. J. 2009.** Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem*, 284, 1136-44.
- Crabtree, M. J., Hale, A. B. & Channon, K. M. 2011.** Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic Biol Med*, 50, 1639-46.
- Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y. J. & Kitsis, R. N. 2004.** The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*, 95, 957-70.
- Csonka, C., Szilvassy, Z., Fulop, F., Pali, T., Blasig, I. E., Tosaki, A., Schulz, R. & Ferdinandy, P. 1999.** Classic preconditioning decreases the harmful accumulation of nitric oxide during ischemia and reperfusion in rat hearts. *Circulation*, 100, 2260-6.
- Curin, Y. & Andriantsitohaina, R. 2005.** Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep*, 57 Suppl, 97-107.
- Davidson, S. M. & Duchon, M. R. 2006.** Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance. *Cardiovasc Res*, 71, 10-21.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. & Packer, L. 1982.** Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107, 1198-205.
- Davis, M. E., Cai, H., Drummond, G. R. & Harrison, D. G. 2001.** Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*, 89, 1073-80.
- de Waard, M. C., van der Velden, J., Bito, V., Ozdemir, S., Biesmans, L., Boontje, N. M., Dekkers, D. H., Schoonderwoerd, K., Schuurbiens, H. C., de Crom, R., Stienen, G. J., Sipido, K. R., Lamers, J. M. & Duncker, D. J. 2007.** Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res*, 100, 1079-88.

- de Waard, M. C., van der Velden, J., Boontje, N. M., Dekkers, D. H., van Haperen, R., Kuster, D. W., Lamers, J. M., de Crom, R. & Duncker, D. J. 2009.** Detrimental effect of combined exercise training and eNOS overexpression on cardiac function after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, H1513-23.
- de Waard, M. C., van Haperen, R., Soullie, T., Tempel, D., de Crom, R. & Duncker, D. J. 2010.** Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 1041-9.
- Delp, M. D., McAllister, R. M. & Laughlin, M. H. 1993.** Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *J Appl Physiol*, 75, 1354-63.
- Demirel, H. A., Powers, S. K., Caillaud, C., Coombes, J. S., Naito, H., Fletcher, L. A., Vrabas, I., Jessup, J. V. & Ji, L. L. 1998.** Exercise training reduces myocardial lipid peroxidation following short-term ischemia-reperfusion. *Med Sci Sports Exerc*, 30, 1211-6.
- Demirel, H. A., Powers, S. K., Zergeroglu, M. A., Shanely, R. A., Hamilton, K., Coombes, J. & Naito, H. 2001.** Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol*, 91, 2205-12.
- Demirel, H. A., Hamilton, K. L., Shanely, R. A., Tumer, N., Koroly, M. J. & Powers, S. K. 2003.** Age and attenuation of exercise-induced myocardial HSP72 accumulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, H1609-15.
- Di Lisa, F., Canton, M., Menabo, R., Dodoni, G. & Bernardi, P. 2003.** Mitochondria and reperfusion injury. The role of permeability transition. *Basic Res Cardiol*, 98, 235-41.
- Di Lisa, F. & Bernardi, P. 2006.** Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res*, 70, 191-9.
- Di Lisa, F., Canton, M., Menabo, R., Kaludercic, N. & Bernardi, P. 2007.** Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail Rev*, 12, 249-60.
- Diffie, G. M., Seversen, E. A. & Titus, M. M. 2001.** Exercise training increases the Ca²⁺ sensitivity of tension in rat cardiac myocytes. *J Appl Physiol*, 91, 309-15.
- Diffie, G. M. & Nagle, D. F. 2003.** Exercise training alters length dependence of contractile properties in rat myocardium. *J Appl Physiol*, 94, 1137-44.
- Dixon, I. M., Kaneko, M., Hata, T., Panagia, V. & Dhalla, N. S. 1990.** Alterations in cardiac membrane Ca²⁺ transport during oxidative stress. *Mol Cell Biochem*, 99, 125-33.
- Droge, W. 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- Drummond, G. R., Cai, H., Davis, M. E., Ramasamy, S. & Harrison, D. G. 2000.** Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*, 86, 347-54.
- Du, X. L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C. & Brownlee, M. 2001.** Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*, 108, 1341-8.

- Dumitrescu, C., Biondi, R., Xia, Y., Cardounel, A. J., Druhan, L. J., Ambrosio, G. & Zweier, J. L. 2007.** Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15081-6.
- Elrod, J. W., Duranski, M. R., Langston, W., Greer, J. J., Tao, L., Dugas, T. R., Kevil, C. G., Champion, H. C. & Lefer, D. J. 2006a.** eNOS gene therapy exacerbates hepatic ischemia-reperfusion injury in diabetes: a role for eNOS uncoupling. *Circ Res*, 99, 78-85.
- Elrod, J. W., Greer, J. J., Bryan, N. S., Langston, W., Szot, J. F., Gebregzlabher, H., Janssens, S., Feelisch, M. & Lefer, D. J. 2006b.** Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1517-23.
- Feron, O. & Balligand, J. L. 2006.** Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc Res*, 69, 788-97.
- Figueroa, X. F., Poblete, I., Fernandez, R., Pedemonte, C., Cortes, V. & Huidobro-Toro, J. P. 2009.** NO production and eNOS phosphorylation induced by epinephrine through the activation of beta-adrenoceptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297, H134-43.
- Fishbein, M. C., Meerbaum, S., Rit, J., Lando, U., Kanmatsuse, K., Mercier, J. C., Corday, E. & Ganz, W. 1981.** Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J*, 101, 593-600.
- Fisslthaler, B., Loot, A. E., Mohamed, A., Busse, R. & Fleming, I. 2008.** Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin. *Circ Res*, 102, 1520-8.
- Fleming, I. 2010.** Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch*, 459, 793-806.
- Fliss, H. & Gattinger, D. 1996.** Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res*, 79, 949-56.
- Flohe, L. & Gunzler, W. A. 1984.** Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105, 114-21.
- Frantz, S., Adamek, A., Fraccarollo, D., Tillmanns, J., Widder, J. D., Dienesch, C., Schafer, A., Podolskaya, A., Held, M., Ruetten, H., Ertl, G. & Bauersachs, J. 2009.** The eNOS enhancer AVE 9488: a novel cardioprotectant against ischemia reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 104, 773-9.
- French, J. P., Quindry, J. C., Falk, D. J., Staib, J. L., Lee, Y., Wang, K. K. & Powers, S. K. 2006.** Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H128-36.
- French, J. P., Hamilton, K. L., Quindry, J. C., Lee, Y., Upchurch, P. A. & Powers, S. K. 2008.** Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J*, 22, 2862-71.
- Fulton, D., Church, J. E., Ruan, L., Li, C., Sood, S. G., Kemp, B. E., Jennings, I. G. & Venema, R. C. 2005.** Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J Biol Chem*, 280, 35943-52.

- Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
- Gaby, A. R. 2010.** Nutritional treatments for acute myocardial infarction. *Altern Med Rev*, 15, 113-23.
- Gao, W. D., Atar, D., Backx, P. H. & Marban, E. 1995.** Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res*, 76, 1036-48.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. & Sessa, W. C. 1998.** Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, 392, 821-4.
- Garlick, P. B., Davies, M. J., Hearse, D. J. & Slater, T. F. 1987.** Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res*, 61, 757-60.
- Gewaltig, M. T. & Kojda, G. 2002.** Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res*, 55, 250-60.
- Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E. & Vina, J. 2008.** Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44, 126-31.
- Gonzalez, D. R., Beigi, F., Treuer, A. V. & Hare, J. M. 2007.** Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20612-7.
- Gottlieb, R. A. 2011.** Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 16, 233-8.
- Green, D. J., Maiorana, A., O'Driscoll, G. & Taylor, R. 2004.** Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol*, 561, 1-25.
- Greif, D. M., Kou, R. & Michel, T. 2002.** Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry*, 41, 15845-53.
- Griendling, K. K., Sorescu, D. & Ushio-Fukai, M. 2000.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86, 494-501.
- Griffin, K. L., Laughlin, M. H. & Parker, J. L. 1999.** Exercise training improves endothelium-mediated vasorelaxation after chronic coronary occlusion. *J Appl Physiol*, 87, 1948-56.
- Grijalva, J., Hicks, S., Zhao, X., Medikayala, S., Kaminski, P. M., Wolin, M. S. & Edwards, J. G. 2008.** Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Cardiovasc Diabetol*, 7, 34.
- Gustafsson, A. B. & Gottlieb, R. A. 2009.** Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res*, 104, 150-8.
- Halliwell, B. 1999.** Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31, 261-72.

- Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. & Gottlieb, R. A. 2006.** Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 281, 29776-87.
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Krankel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J. F., Mohr, F. W. & Schuler, G. 2003.** Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 107, 3152-8.
- Hamilton, K. L., Powers, S. K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N. & Mehta, J. L. 2001.** Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H1346-52.
- Hamilton, K. L., Staib, J. L., Phillips, T., Hess, A., Lennon, S. L. & Powers, S. K. 2003.** Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 34, 800-9.
- Hamilton, K. L., Quindry, J. C., French, J. P., Staib, J., Hughes, J., Mehta, J. L. & Powers, S. K. 2004.** MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med*, 37, 1360-8.
- Han, H., Kaiser, R., Hu, K., Laser, M., Ertl, G. & Bauersachs, J. 2003.** Selective modulation of endogenous nitric oxide formation in ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts--effects on regional myocardial flow and enzyme release. *Basic Res Cardiol*, 98, 165-74.
- Hare, J. M. 2003.** Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 719-29.
- Harris, M. B., Ju, H., Venema, V. J., Liang, H., Zou, R., Michell, B. J., Chen, Z. P., Kemp, B. E. & Venema, R. C. 2001.** Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*, 276, 16587-91.
- Hearse, D. J., Humphrey, S. M. & Bullock, G. R. 1978.** The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol*, 10, 641-68.
- Heusch, G., Boengler, K. & Schulz, R. 2008.** Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation*, 118, 1915-9.
- Heyndrickx, G. R., Millard, R. W., McRitchie, R. J., Maroko, P. R. & Vatner, S. F. 1975.** Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*, 56, 978-85.
- Hu, H., Chiamvimonvat, N., Yamagishi, T. & Marban, E. 1997.** Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. *Circ Res*, 81, 742-52.
- Huggins, C. E., Bell, J. R., Pepe, S. & Delbridge, L. M. 2008.** Benchmarking ventricular arrhythmias in the mouse--revisiting the 'Lambeth Conventions' 20 years on. *Heart Lung Circ*, 17, 445-50.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. 1987.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9265-9.
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A. & Napoli, C. 1999.** Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, 34, 879-86.

- Ignarro, L. J., Balestrieri, M. L. & Napoli, C. 2007.** Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res*, 73, 326-40.
- Ikeda, U., Maeda, Y., Kawahara, Y., Yokoyama, M. & Shimada, K. 1995.** Angiotensin II augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *Circulation*, 92, 2683-9.
- Imagawa, J., Yellon, D. M. & Baxter, G. F. 1999.** Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol*, 126, 701-8.
- Imahashi, K., Pott, C., Goldhaber, J. I., Steenbergen, C., Philipson, K. D. & Murphy, E. 2005.** Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, 97, 916-21.
- Ivanov, F., Mewton, N., Rioufol, G., Piot, C., Elbaz, M., Revel, D., Croisille, P. & Ovize, M. 2010.** Cardioprotection in the clinical setting. *Cardiovasc Drugs Ther*, 24, 281-7.
- Iwakiri, Y., Satoh, A., Chatterjee, S., Toomre, D. K., Chalouni, C. M., Fulton, D., Groszmann, R. J., Shah, V. H. & Sessa, W. C. 2006.** Nitric oxide synthase generates nitric oxide locally to regulate compartmentalized protein S-nitrosylation and protein trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19777-82.
- Iwakura, K., Ito, H., Nishikawa, N., Hiraoka, K., Sugimoto, K., Higashino, Y., Masuyama, T., Hori, M., Fujii, K. & Minamino, T. 1999.** Early temporal changes in coronary flow velocity patterns in patients with acute myocardial infarction demonstrating the "no-reflow" phenomenon. *Am J Cardiol*, 84, 415-9.
- Jekabsone, A., Ivanoviene, L., Brown, G. C. & Borutaite, V. 2003.** Nitric oxide and calcium together inactivate mitochondrial complex I and induce cytochrome c release. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 803-9.
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A. & Linn, H. 1960.** Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, 70, 68-78.
- Jennings, R. B. & Reimer, K. A. 1983.** Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation*, 68, 125-36.
- Jeremias, I., Kupatt, C., Martin-Villalba, A., Habazettl, H., Schenkel, J., Boekstegers, P. & Debatin, K. M. 2000.** Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation*, 102, 915-20.
- Jiao, X. Y., Gao, E., Yuan, Y., Wang, Y., Lau, W. B., Koch, W., Ma, X. L. & Tao, L. 2009.** INO-4885 [5,10,15,20-tetra[N-(benzyl-4'-carboxylate)-2-pyridinium]-21H,23H-porphine iron(III) chloride], a peroxynitrite decomposition catalyst, protects the heart against reperfusion injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 328, 777-84.
- Johnson, L. R., Rush, J. W., Turk, J. R., Price, E. M. & Laughlin, M. H. 2001.** Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries. *J Appl Physiol*, 90, 1102-10.
- Jones, S. P., Greer, J. J., van Haperen, R., Duncker, D. J., de Crom, R. & Lefer, D. J. 2003.** Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4891-6.

- Jones, S. P., Greer, J. J., Kakkar, A. K., Ware, P. D., Turnage, R. H., Hicks, M., van Haperen, R., de Crom, R., Kawashima, S., Yokoyama, M. & Lefer, D. J. 2004. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H276-82.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., *et al.* 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-54.
- Karuppiah, K., Druhan, L. J., Chen, C. A., Smith, T., Zweier, J. L., Sessa, W. C. & Cardounel, A. J. 2011. Suppression of eNOS-derived superoxide by caveolin-1: a biopterin-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H903-11.
- Kavazis, A. N., McClung, J. M., Hood, D. A. & Powers, S. K. 2008. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294, H928-35.
- Kemi, O. J., Ellingsen, O., Ceci, M., Grimaldi, S., Smith, G. L., Condorelli, G. & Wisloff, U. 2007. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol*, 43, 354-61.
- Kemi, O. J., Ceci, M., Condorelli, G., Smith, G. L. & Wisloff, U. 2008. Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase function is increased by aerobic interval training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 15, 145-8.
- Kemi, O. J. & Wisloff, U. 2010. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol (Oxf)*, 199, 425-39.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Keyes, K. T., Xu, J., Long, B., Zhang, C., Hu, Z. & Ye, Y. 2010. Pharmacological inhibition of PTEN limits myocardial infarct size and improves left ventricular function postinfarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298, H1198-208.
- Khan, S. A., Skaf, M. W., Harrison, R. W., Lee, K., Minhas, K. M., Kumar, A., Fradley, M., Shoukas, A. A., Berkowitz, D. E. & Hare, J. M. 2003. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res*, 92, 1322-9.
- Kim, Y. M., Talanian, R. V. & Billiar, T. R. 1997. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 272, 31138-48.
- Kloner, R. A., Ganote, C. E. & Jennings, R. B. 1974. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*, 54, 1496-508.
- Kobara, M., Tatsumi, T., Takeda, M., Mano, A., Yamanaka, S., Shiraishi, J., Keira, N., Matoba, S., Asayama, J. & Nakagawa, M. 2003. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol*, 98, 319-28.

- Kojda, G., Kottenberg, K., Nix, P., Schluter, K. D., Piper, H. M. & Noack, E. 1996.** Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 78, 91-101.
- Kojda, G. & Kottenberg, K. 1999.** Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res*, 41, 514-23.
- Kojda, G. & Hambrecht, R. 2005.** Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res*, 67, 187-97.
- Korge, P., Ping, P. & Weiss, J. N. 2008.** Reactive oxygen species production in energized cardiac mitochondria during hypoxia/reoxygenation: modulation by nitric oxide. *Circ Res*, 103, 873-80.
- Krause, S. M., Jacobus, W. E. & Becker, L. C. 1989.** Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ Res*, 65, 526-30.
- Krug, A., Du Mesnil de, R. & Korb, G. 1966.** Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ Res*, 19, 57-62.
- Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D. N. 1991.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4651-5.
- Kupatt, C., Dessy, C., Hinkel, R., Raake, P., Daneau, G., Bouzin, C., Boekstegers, P. & Feron, O. 2004.** Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1435-41.
- Kuster, G. M., Lancel, S., Zhang, J., Communal, C., Trucillo, M. P., Lim, C. C., Pfister, O., Weinberg, E. O., Cohen, R. A., Liao, R., Siwik, D. A. & Colucci, W. S. 2010.** Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med*, 48, 1182-7.
- Kuzkaya, N., Weissmann, N., Harrison, D. G. & Dikalov, S. 2003.** Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 278, 22546-54.
- Kwon, N. S., Nathan, C. F. & Stuehr, D. J. 1989.** Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem*, 264, 20496-501.
- Latchman, D. S. 2001.** Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*, 51, 637-46.
- Lauer, N., Suvorava, T., Ruther, U., Jacob, R., Meyer, W., Harrison, D. G. & Kojda, G. 2005.** Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res*, 65, 254-62.
- Laughlin, M. H., Bowles, D. K. & Duncker, D. J. 2012.** The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H10-23.
- Laurita, K. R. & Rosenbaum, D. S. 2008.** Cellular mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans. *Prog Biophys Mol Biol*, 97, 332-47.
- Layland, J., Li, J. M. & Shah, A. M. 2002.** Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol*, 540, 457-67.

- Lee, I. M. & Paffenbarger, R. S., Jr. 2000.** Associations of light, moderate, and vigorous intensity physical activity with longevity. The Harvard Alumni Health Study. *Am J Epidemiol*, 151, 293-9.
- Lee, P., Sata, M., Lefer, D. J., Factor, S. M., Walsh, K. & Kitsis, R. N. 2003.** Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H456-63.
- Lefer, D. J., Nakanishi, K., Johnston, W. E. & Vinten-Johansen, J. 1993.** Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion of dogs. *Circulation*, 88, 2337-50.
- Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S. & Nicotera, P. 1999.** Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res*, 249, 396-403.
- Li, D., Qu, Y., Tao, L., Liu, H., Hu, A., Gao, F., Sharifi-Azad, S., Grunwald, Z., Ma, X. L. & Sun, J. Z. 2006.** Inhibition of iNOS protects the aging heart against beta-adrenergic receptor stimulation-induced cardiac dysfunction and myocardial ischemic injury. *J Surg Res*, 131, 64-72.
- Lima, B., Forrester, M. T., Hess, D. T. & Stamler, J. S. 2010.** S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res*, 106, 633-46.
- Lin, M. I., Fulton, D., Babbitt, R., Fleming, I., Busse, R., Pritchard, K. A., Jr. & Sessa, W. C. 2003.** Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem*, 278, 44719-26.
- Liu, J., Garcia-Cardena, G. & Sessa, W. C. 1996.** Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*, 35, 13277-81.
- Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D. 2002.** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*, 80, 780-7.
- Lokuta, A. J., Maertz, N. A., Meethal, S. V., Potter, K. T., Kamp, T. J., Valdivia, H. H. & Haworth, R. A. 2005.** Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation*, 111, 988-95.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- Lu, L., Mei, D. F., Gu, A. G., Wang, S., Lentzner, B., Gutstein, D. E., Zwas, D., Homma, S., Yi, G. H. & Wang, J. 2002.** Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure. *J Appl Physiol*, 92, 1524-30.
- Lu, Y. M., Han, F., Shioda, N., Moriguchi, S., Shirasaki, Y., Qin, Z. H. & Fukunaga, K. 2009.** Phenylephrine-induced cardiomyocyte injury is triggered by superoxide generation through uncoupled endothelial nitric-oxide synthase and ameliorated by 3-[2-[4-(3-chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-5,6-dimethoxyindazole (DY-9836), a novel calmodulin antagonist. *Mol Pharmacol*, 75, 101-12.

- Lubbe, W. F. & Opie, L. H. 1987.** Metabolic basis of increased vulnerability to fibrillation in myocardial ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*, 19 Suppl 5, 1-3.
- Ma, X. L., Weyrich, A. S., Lefer, D. J. & Lefer, A. M. 1993.** Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res*, 72, 403-12.
- Maejima, Y., Adachi, S., Morikawa, K., Ito, H. & Isobe, M. 2005.** Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol*, 38, 163-74.
- Mann, J. K., Tager, I. B., Lurmann, F., Segal, M., Quesenberry, C. P., Jr., Lugg, M. M., Shan, J. & Van Den Eeden, S. K. 2002.** Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ Health Perspect*, 110, 1247-52.
- Manning, A. S., Coltart, D. J. & Hearse, D. J. 1984.** Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res*, 55, 545-8.
- Manning, A. S. & Hearse, D. J. 1984.** Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*, 16, 497-518.
- Marklund, S. 1976.** Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, 251, 7504-7.
- Maron, B. A., Tang, S. S. & Loscalzo, J. 2012.** S-Nitrosothiols and the S-Nitrosoproteome of the Cardiovascular System. *Antioxid Redox Signal*.
- Masano, T., Kawashima, S., Toh, R., Satomi-Kobayashi, S., Shinohara, M., Takaya, T., Sasaki, N., Takeda, M., Tawa, H., Yamashita, T., Yokoyama, M. & Hirata, K. 2008.** Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: the possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Circ J*, 72, 1512-9.
- Massion, P. B. & Balligand, J. L. 2003.** Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol*, 546, 63-75.
- Massion, P. B., Feron, O., Dessy, C. & Balligand, J. L. 2003.** Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res*, 93, 388-98.
- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B. & Sadoshima, J. 2007.** Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*, 100, 914-22.
- Mauri, L., Rogers, C. & Baim, D. S. 2006.** Devices for distal protection during percutaneous coronary revascularization. *Circulation*, 113, 2651-6.
- McAllister, R. M., Newcomer, S. C. & Laughlin, M. H. 2008.** Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33, 173-8.
- McCord, J. M., Roy, R. S. & Schaffer, S. W. 1985.** Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv Myocardiol*, 5, 183-9.

- Medeiros, A., Rolim, N. P., Oliveira, R. S., Rosa, K. T., Mattos, K. C., Casarini, D. E., Irigoyen, M. C., Krieger, E. M., Krieger, J. E., Negrao, C. E. & Brum, P. C. 2008.** Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol*, 104, 103-9.
- Mery, P. F., Lohmann, S. M., Walter, U. & Fischmeister, R. 1991.** Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1197-201.
- Mery, P. F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F. & Fischmeister, R. 1993.** Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem*, 268, 26286-95.
- Meyer, G., Andre, L., Tanguy, S., Boissiere, J., Farah, C., Lopez-Lauri, F., Gayrard, S., Richard, S., Boucher, F., Cazorla, O., Obert, P. & Reboul, C. 2010.** Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298, H1445-53.
- Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P. & Michel, T. 1997.** Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 272, 25907-12.
- Mizote, I., Ueda, Y., Ohtani, T., Shimizu, M., Takeda, Y., Oka, T., Tsujimoto, M., Hirayama, A., Hori, M. & Kodama, K. 2005.** Distal protection improved reperfusion and reduced left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction who had angiographically defined ruptured plaque. *Circulation*, 112, 1001-7.
- Moens, A. L. & Kass, D. A. 2006.** Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 2439-44.
- Moens, A. L., Takimoto, E., Tocchetti, C. G., Chakir, K., Bedja, D., Cormaci, G., Ketner, E. A., Majmudar, M., Gabrielson, K., Halushka, M. K., Mitchell, J. B., Biswal, S., Channon, K. M., Wolin, M. S., Alp, N. J., Paolocci, N., *et al.* 2008.** Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation*, 117, 2626-36.
- Mohan, P., Brutsaert, D. L., Paulus, W. J. & Sys, S. U. 1996.** Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation*, 93, 1223-9.
- Moncada, S., Palmer, R. M. & Higgs, E. A. 1991.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-42.
- Moore, R. L., Musch, T. I., Yelamarty, R. V., Scaduto, R. C., Jr., Semanchick, A. M., Elensky, M. & Cheung, J. Y. 1993.** Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*, 264, C1180-9.
- Mount, P. F., Kemp, B. E. & Power, D. A. 2007.** Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*, 42, 271-9.
- Murphy, E. & Steenbergen, C. 2008.** Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*, 88, 581-609.

- Myers, J., Prakash, M., Froelicher, V., Do, D., Partington, S. & Atwood, J. E. 2002.** Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med*, 346, 793-801.
- Nishijima, Y., Sridhar, A., Bonilla, I., Velayutham, M., Khan, M., Terentyeva, R., Li, C., Kuppasamy, P., Elton, T. S., Terentyev, D., Gyorke, S., Zweier, J. L., Cardounel, A. J. & Carnes, C. A. 2011.** Tetrahydrobiopterin depletion and NOS2 uncoupling contribute to heart failure-induced alterations in atrial electrophysiology. *Cardiovasc Res*, 91, 71-9.
- Nottin, S., Doucende, G., Schuster-Beck, I., Dautat, M. & Obert, P. 2008.** Alteration in left ventricular normal and shear strains evaluated by 2D-strain echocardiography in the athlete's heart. *J Physiol*, 586, 4721-33.
- O'Connor, G. T., Buring, J. E., Yusuf, S., Goldhaber, S. Z., Olmstead, E. M., Paffenbarger, R. S., Jr. & Hennekens, C. H. 1989.** An overview of randomized trials of rehabilitation with exercise after myocardial infarction. *Circulation*, 80, 234-44.
- O'Rourke, B. 2004.** Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res*, 94, 420-32.
- Octavia, Y., Brunner-La Rocca, H. P. & Moens, A. L. 2012.** NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the failing heart: From pathogenic roles to therapeutic approach. *Free Radic Biol Med*, 52, 291-7.
- Okazaki, T., Otani, H., Shimazu, T., Yoshioka, K., Fujita, M. & Iwasaka, T. 2011.** Ascorbic acid and N-acetyl cysteine prevent uncoupling of nitric oxide synthase and increase tolerance to ischemia/reperfusion injury in diabetic rat heart. *Free Radic Res*, 45, 1173-83.
- Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X. M., Philipp, S., Critz, S. D., Cohen, M. V. & Downey, J. M. 2004.** Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H468-76.
- Opie, L. H., Nathan, D. & Lubbe, W. F. 1979.** Biochemical aspects of arrhythmogenesis and ventricular fibrillation. *Am J Cardiol*, 43, 131-48.
- Opie, L. H. 1990.** Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis. *Cardiovasc Drugs Ther*, 4 Suppl 4, 777-90.
- Otani, H. 2009.** The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1913-28.
- Pabla, R., Buda, A. J., Flynn, D. M., Blesse, S. A., Shin, A. M., Curtis, M. J. & Lefer, D. J. 1996.** Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res*, 78, 65-72.
- Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. 2007.** Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 315-424.
- Paffenbarger, R. S., Jr., Hyde, R. T., Hsieh, C. C. & Wing, A. L. 1986.** Physical activity, other life-style patterns, cardiovascular disease and longevity. *Acta Med Scand Suppl*, 711, 85-91.

- Pagliari, P., Moro, F., Tullio, F., Perrelli, M. G. & Penna, C. 2011.** Cardioprotective pathways during reperfusion: focus on redox signaling and other modalities of cell signaling. *Antioxid Redox Signal*, 14, 833-50.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. 1987.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-6.
- Palmer, B. M., Thayer, A. M., Snyder, S. M. & Moore, R. L. 1998.** Shortening and [Ca²⁺] dynamics of left ventricular myocytes isolated from exercise-trained rats. *J Appl Physiol*, 85, 2159-68.
- Palmer, B. S., Hadziahmetovic, M., Veci, T. & Angelos, M. G. 2004.** Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation*, 62, 97-106.
- Penpargkul, S. & Scheuer, J. 1970.** The effect of physical training upon the mechanical and metabolic performance of the rat heart. *J Clin Invest*, 49, 1859-68.
- Petroff, M. G., Kim, S. H., Pepe, S., Dessy, C., Marban, E., Balligand, J. L. & Sollott, S. J. 2001.** Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes. *Nat Cell Biol*, 3, 867-73.
- Pike, M. M., Luo, C. S., Clark, M. D., Kirk, K. A., Kitakaze, M., Madden, M. C., Cragoe, E. J., Jr. & Pohost, G. M. 1993.** NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol*, 265, H2017-26.
- Pluim, B. M., Zwinderman, A. H., van der Laarse, A. & van der Wall, E. E. 2000.** The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*, 101, 336-44.
- Powers, S. K., Demirel, H. A., Vincent, H. K., Coombes, J. S., Naito, H., Hamilton, K. L., Shanely, R. A. & Jessup, J. 1998.** Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*, 275, R1468-77.
- Powers, S. K. & Jackson, M. J. 2008.** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88, 1243-76.
- Powers, S. K., Quindry, J. C. & Kavazis, A. N. 2008.** Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, 44, 193-201.
- Przyklenk, K., Dong, Y., Undyala, V. V. & Whittaker, P. 2012.** Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc Res*, 94, 197-205.
- Puymirat, E., Simon, T., Steg, P. G., Schiele, F., Gueret, P., Blanchard, D., Khalife, K., Goldstein, P., Cattan, S., Vaur, L., Cambou, J. P., Ferrieres, J. & Danchin, N. 2012.** Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA*, 308, 998-1006.
- Quindry, J. C., Hamilton, K. L., French, J. P., Lee, Y., Murlasits, Z., Tumer, N. & Powers, S. K. 2007.** Exercise-induced HSP-72 elevation and cardioprotection against infarct and apoptosis. *J Appl Physiol*, 103, 1056-62.
- Quindry, J. C., Schreiber, L., Hosick, P., Wrieden, J., Irwin, J. M. & Hoyt, E. 2010.** Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299, H175-83.

- Ramires, P. R. & Ji, L. L. 2001.** Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H679-88.
- Rastaldo, R., Pagliaro, P., Cappello, S., Penna, C., Mancardi, D., Westerhof, N. & Losano, G. 2007.** Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci*, 81, 779-93.
- Ray, P. D., Huang, B. W. & Tsuji, Y. 2012.** Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*, 24, 981-90.
- Reboul, C., Thireau, J., Meyer, G., Andre, L., Obert, P., Cazorla, O. & Richard, S. 2012.** Carbon monoxide exposure in the urban environment: An insidious foe for the heart? *Respir Physiol Neurobiol*.
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M. & Jennings, R. B. 1977.** The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56, 786-94.
- Reimer, K. A. & Jennings, R. B. 1979.** The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest*, 40, 633-44.
- Roe, N. D. & Ren, J. 2012.** Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol*, 57, 168-72.
- Rolim, N. P., Medeiros, A., Rosa, K. T., Mattos, K. C., Irigoyen, M. C., Krieger, E. M., Krieger, J. E., Negrao, C. E. & Brum, P. C. 2007.** Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*, 29, 246-52.
- Ryou, M. G., Sun, J., Oguayo, K. N., Manukhina, E. B., Downey, H. F. & Mallet, R. T. 2008.** Hypoxic conditioning suppresses nitric oxide production upon myocardial reperfusion. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233, 766-74.
- Samoli, E., Touloumi, G., Schwartz, J., Anderson, H. R., Schindler, C., Forsberg, B., Vigotti, M. A., Vonk, J., Kosnik, M., Skorkovsky, J. & Katsouyanni, K. 2007.** Short-term effects of carbon monoxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Environ Health Perspect*, 115, 1578-83.
- Sasaki, N., Sato, T., Ohler, A., O'Rourke, B. & Marban, E. 2000.** Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation*, 101, 439-45.
- Schmidt, T. S. & Alp, N. J. 2007.** Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin Sci (Lond)*, 113, 47-63.
- Schofer, J., Montz, R. & Mathey, D. G. 1985.** Scintigraphic evidence of the "no reflow" phenomenon in human beings after coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol*, 5, 593-8.
- Schulz, R., Kelm, M. & Heusch, G. 2004.** Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61, 402-13.
- Schwartz, B. G. & Kloner, R. A. 2012.** Coronary no reflow. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 873-82.

- Sears, C. E., Bryant, S. M., Ashley, E. A., Lygate, C. A., Rakovic, S., Wallis, H. L., Neubauer, S., Terrar, D. A. & Casadei, B. 2003.** Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res*, 92, e52-9.
- Searles, C. D. 2006.** Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C803-16.
- Seddon, M., Shah, A. M. & Casadei, B. 2007.** Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res*, 75, 315-26.
- Sessa, W. C., Barber, C. M. & Lynch, K. R. 1993.** Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ Res*, 72, 921-4.
- Sessa, W. C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J. & Hintze, T. H. 1994.** Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res*, 74, 349-53.
- Shah, A. M. & MacCarthy, P. A. 2000.** Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther*, 86, 49-86.
- Sheiban, I., Tonni, S., Chizzoni, A., Marini, A. & Trevisi, G. 1997.** Recovery of left ventricular function following early reperfusion in acute myocardial infarction: a potential role for the calcium antagonist nisoldipine. *Cardiovasc Drugs Ther*, 11, 5-16.
- Steenbergen, C., Murphy, E., Watts, J. A. & London, R. E. 1990.** Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res*, 66, 135-46.
- Steenbergen, C., Fralix, T. A. & Murphy, E. 1993.** Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. *Basic Res Cardiol*, 88, 456-70.
- Stern, F. B., Halperin, W. E., Hornung, R. W., Ringenburg, V. L. & McCammon, C. S. 1988.** Heart disease mortality among bridge and tunnel officers exposed to carbon monoxide. *Am J Epidemiol*, 128, 1276-88.
- Sugiyama, T., Levy, B. D. & Michel, T. 2009.** Tetrahydrobiopterin recycling, a key determinant of endothelial nitric-oxide synthase-dependent signaling pathways in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 284, 12691-700.
- Sun, J., Picht, E., Ginsburg, K. S., Bers, D. M., Steenbergen, C. & Murphy, E. 2006a.** Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca²⁺ channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ Res*, 98, 403-11.
- Sun, J., Steenbergen, C. & Murphy, E. 2006b.** S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1693-705.
- Sun, J., Morgan, M., Shen, R. F., Steenbergen, C. & Murphy, E. 2007.** Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ Res*, 101, 1155-63.
- Sun, J. & Murphy, E. 2010.** Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res*, 106, 285-96.

- Suzuki, K., Murtuza, B., Sammut, I. A., Latif, N., Jayakumar, J., Smolenski, R. T., Kaneda, Y., Sawa, Y., Matsuda, H. & Yacoub, M. H. 2002.** Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation*, 106, 1270-6.
- Szelid, Z., Pokreisz, P., Liu, X., Vermeersch, P., Marsboom, G., Gillijns, H., Pellens, M., Verbeken, E., Van de Werf, F., Collen, D. & Janssens, S. P. 2010.** Cardiospecific nitric oxide synthase 3 gene transfer protects against myocardial reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 105, 169-79.
- Takagi, H., Matsui, Y. & Sadoshima, J. 2007.** The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxid Redox Signal*, 9, 1373-81.
- Takano, H., Tang, X. L., Qiu, Y., Guo, Y., French, B. A. & Bolli, R. 1998.** Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res*, 83, 73-84.
- Talukder, M. A., Zweier, J. L. & Periasamy, M. 2009.** Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*, 84, 345-52.
- Tayeh, M. A. & Marletta, M. A. 1989.** Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem*, 264, 19654-8.
- Tennant, R. 1936.** Studies in the Pathology of Vascular disease: Studies on Experimental Coronary Occlusion. *Yale J Biol Med*, 9, 60-64 8.
- Ter Keurs, H. E. & Boyden, P. A. 2007.** Calcium and arrhythmogenesis. *Physiol Rev*, 87, 457-506.
- Thony, B., Auerbach, G. & Blau, N. 2000.** Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*, 347 Pt 1, 1-16.
- Tiefenbacher, C. P., Chilian, W. M., Mitchell, M. & DeFily, D. V. 1996.** Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 94, 1423-9.
- Tiefenbacher, C. P., Bleeke, T., Vahl, C., Amann, K., Vogt, A. & Kubler, W. 2000.** Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation*, 102, 2172-9.
- Tiefenbacher, C. P., Lee, C. H., Kapitza, J., Dietz, V. & Niroomand, F. 2003.** Sepsis reduces postischemic injury in the rat heart. *Pflugers Arch*, 447, 1-7.
- Turrens, J. F. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-44.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M. & Harrison, D. G. 1995.** Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*, 269, C1371-8.
- Umar, S. & van der Laarse, A. 2010.** Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem*, 333, 191-201.

- Valentim, L., Laurence, K. M., Townsend, P. A., Carroll, C. J., Soond, S., Scarabelli, T. M., Knight, R. A., Latchman, D. S. & Stephanou, A. 2006. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 40, 846-52.
- Valverde, C. A., Kornyejev, D., Ferreiro, M., Petrosky, A. D., Mattiazzi, A. & Escobar, A. L. 2010. Transient Ca²⁺ depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 85, 671-80.
- van Empel, V. P., Bertrand, A. T., Hofstra, L., Crijns, H. J., Doevendans, P. A. & De Windt, L. J. 2005. Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*, 67, 21-9.
- Vasquez-Vivar, J., Martasek, P., Whitsett, J., Joseph, J. & Kalyanaraman, B. 2002. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J*, 362, 733-9.
- Verma, S., Maitland, A., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Pomroy, N. C., Li, S. H., Mickle, D. A., Li, R. K. & Rao, V. 2002. Novel cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin after anoxia and reoxygenation: Identifying cellular targets for pharmacologic manipulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 123, 1074-83.
- Vila-Petroff, M. G., Younes, A., Egan, J., Lakatta, E. G. & Sollott, S. J. 1999. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res*, 84, 1020-31.
- Wajima, T., Shimizu, S., Hiroi, T., Ishii, M. & Kiuchi, Y. 2006. Reduction of myocardial infarct size by tetrahydrobiopterin: possible involvement of mitochondrial KATP channels activation through nitric oxide production. *J Cardiovasc Pharmacol*, 47, 243-9.
- Walker, M. J., Curtis, M. J., Hearse, D. J., Campbell, R. W., Janse, M. J., Yellon, D. M., Cobbe, S. M., Coker, S. J., Harness, J. B., Harron, D. W. & et al. 1988. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 22, 447-55.
- Wang, P. & Zweier, J. L. 1996. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*, 271, 29223-30.
- Wang, X. L., Liu, H. R., Tao, L., Liang, F., Yan, L., Zhao, R. R., Lopez, B. L., Christopher, T. A. & Ma, X. L. 2007. Role of iNOS-derived reactive nitrogen species and resultant nitrative stress in leukocytes-induced cardiomyocyte apoptosis after myocardial ischemia/reperfusion. *Apoptosis*, 12, 1209-17.
- Wang, H., Kohr, M. J., Traynham, C. J., Wheeler, D. G., Janssen, P. M. & Ziolo, M. T. 2008. Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, C1566-75.
- Warburton, D. E., Nicol, C. W. & Bredin, S. S. 2006. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*, 174, 801-9.
- Weiss, J. N., Korge, P., Honda, H. M. & Ping, P. 2003. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res*, 93, 292-301.

- West, M. B., Rokosh, G., Obal, D., Velayutham, M., Xuan, Y. T., Hill, B. G., Keith, R. J., Schrader, J., Guo, Y., Conklin, D. J., Prabhu, S. D., Zweier, J. L., Bolli, R. & Bhatnagar, A. 2008.** Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation*, 118, 1970-8.
- Whelan, S. A. & Hart, G. W. 2003.** Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ Res*, 93, 1047-58.
- White, F. C., Bloor, C. M., McKirnan, M. D. & Carroll, S. M. 1998.** Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol*, 85, 1160-8.
- Widder, J. D., Chen, W., Li, L., Dikalov, S., Thony, B., Hatakeyama, K. & Harrison, D. G. 2007.** Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis by shear stress. *Circ Res*, 101, 830-8.
- Wildhirt, S. M., Suzuki, H., Horstman, D., Weismuller, S., Dudek, R. R., Akiyama, K. & Reichart, B. 1997.** Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation*, 96, 1616-23.
- Willerson, J. T. & Buja, L. M. 1990.** Protection of the myocardium during myocardial infarction: pharmacologic protection during thrombolytic therapy. *Am J Cardiol*, 65, 351-411.
- Wilson, L. D. & Rosenbaum, D. S. 2007.** Mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans. *Europace*, 9 Suppl 6, vi77-82.
- Wisloff, U., Loennechen, J. P., Falck, G., Beisvag, V., Currie, S., Smith, G. & Ellingsen, O. 2001.** Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res*, 50, 495-508.
- Wisloff, U., Loennechen, J. P., Currie, S., Smith, G. L. & Ellingsen, O. 2002.** Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 54, 162-74.
- Wolf, B. B. & Green, D. R. 1999.** Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*, 274, 20049-52.
- Wright, G. R., Jewczyk, S., Onrot, J., Tomlinson, P. & Shephard, R. J. 1975.** Carbon monoxide in the urban atmosphere: hazards to the pedestrian and the street-worker. *Arch Environ Health*, 30, 123-9.
- Xia, Y. 2007.** Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid Redox Signal*, 9, 1773-8.
- Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G. & Stamler, J. S. 1998.** Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*, 279, 234-7.
- Xu, Z., Ji, X. & Boysen, P. G. 2004.** Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286, H1433-40.
- Xu, Y., Liu, B., Zweier, J. L. & He, G. 2008.** Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 327, 402-10.

- Yamashiro, S., Noguchi, K., Matsuzaki, T., Miyagi, K., Nakasone, J., Sakanashi, M. & Koja, K. 2002.** Beneficial effect of tetrahydrobiopterin on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124, 775-84.
- Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T. & Hori, M. 1999.** Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med*, 189, 1699-706.
- Yan, L., Vatner, D. E., Kim, S. J., Ge, H., Masurekar, M., Massover, W. H., Yang, G., Matsui, Y., Sadoshima, J. & Vatner, S. F. 2005.** Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13807-12.
- Yang, C., Talukder, M. A., Varadharaj, S., Velayutham, M. & Zweier, J. L. 2012.** Early Ischemic Preconditioning Requires Akt- and PKA-mediated Activation of eNOS via Serine1176 Phosphorylation. *Cardiovasc Res*.
- Yasmin, W., Strynadka, K. D. & Schulz, R. 1997.** Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res*, 33, 422-32.
- Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I. F., Bauer, M. P., Lin, M. I., Drab, M., Kurzchalia, T. V., Stan, R. V. & Sessa, W. C. 2006.** Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest*, 116, 1284-91.
- Zaobornyj, T. & Ghafourifar, P. 2012.** Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Zhang, J., Jin, B., Li, L., Block, E. R. & Patel, J. M. 2005.** Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, C840-9.
- Zhang, Q. J., McMillin, S. L., Tanner, J. M., Palionyte, M., Abel, E. D. & Symons, J. D. 2009.** Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol*, 587, 3911-20.
- Zhou, M., Widmer, R. J., Xie, W., Jimmy Widmer, A., Miller, M. W., Schroeder, F., Parker, J. L. & Heaps, C. L. 2010.** Effects of exercise training on cellular mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation in coronary arteries after chronic occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298, H1857-69.
- Zima, A. V. & Blatter, L. A. 2006.** Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res*, 71, 310-21.
- Zou, M. H., Shi, C. & Cohen, R. A. 2002.** Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*, 109, 817-26.
- Zweier, J. L., Flaherty, J. T. & Weisfeldt, M. L. 1987.** Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 1404-7.
- Zweier, J. L., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. 1999.** Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 250-62.
- Zweier, J. L., Fertmann, J. & Wei, G. 2001.** Nitric oxide and peroxynitrite in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal*, 3, 11-22.

- Zweier, J. L. & Talukder, M. A. 2006.** The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 70, 181-90.
- Zweier, J. L., Chen, C. A. & Druhan, L. J. 2011.** S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling. *Antioxid Redox Signal*, 14, 1769-75.

Liste des figures et tableaux

I. Figures

REVUE DE LITTERATURE

Figure I.1 : Altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours de l'ischémie. NHE : échangeur Na^+/H^+ ; Ca^{2+} -ATPase : pompe calcique dépendante de l'ATP ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Adapté de la thèse de G.Meyer, 2010. 21

Figure I.2 : Effets de la surcharge calcique et du stress oxydant dans les troubles de la reperfusion myocardique. RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. mPTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale. Adapté de la thèse de G.Meyer, 2010. 24

Figure I.3 : Système antioxydant enzymatique. SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; CAT : catalase. 35

Figure I.4 : Synthèse du NO par la eNOS et découplage de la eNOS par déplétion en BH_4 . Adapté de Lu *et al.* 2009. 40

Figure I.5 : Voies de biosynthèse et de recyclage du BH_4 . Adapté de Schmidt & Alp, 2007. 41

Figure I.6 : Régulation post-transcriptionnelle de la eNOS par interaction protéique et phosphorylation. Cav : cavéoline ; CaM : calmoduline ; hsp90 : *heat shock protein* (90 kDa). Adapté de Balligand *et al.*, 2009. 45

Figure I.7 : Régulation post-transcriptionnelle de la eNOS par phosphorylation. Adapté de Fleming, 2010. 47

Figure I.8 : Effets du NO dans le cardiomyocyte : voie « indirecte » GMPc dépendante. NO : monoxyde d'azote ; GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique ; PDE III : phosphodiesterase III ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A ; VOC : canaux calcique voltage dépendants ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PKG : protéine kinase.....51

Figure I.9 : Effets autocrines et paracrines du NO synthétisé par le eNOS (NOS3) et la nNOS (NOS1). LTCC : L-Type Ca^{2+} channel ; PMCA : plasmalemma Ca^{2+} -ATPase ; NCX : échangeur Na^+/Ca^{2+} ; RyR : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Adapté de Carnicer *et al.*, 2012.....53

Figure I.10 : Effets du NO dans la régulation de la fonction cardiomyocytaire. NO : monoxyde d'azote ; GCs : guanylate cyclase soluble ; GTP : guanosine tri-phosphate ; GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique ; PDE III : phosphodiesterase III ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A ; VOC : canaux calcique voltage dépendants ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PKG : protéine kinase G ; Cyt-c : cytochrome-c oxydase. Adapté de Shah & Mac Carthy, 2000.....54

Figure I.11 : Voies de cardioprotection par S-nitrosylation. NO : monoxyde d'azote ; nNOS : nitrique oxyde synthétase neuronale ; eNOS : nitrique oxyde synthétase endothéliale. LTCC : L-Type Ca^{2+} channel ; RyR : récepteur à la ryanodine ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène.....58

Figure I.12 : Principales cibles cellulaires des adaptations à l'exercice en endurance sur le système cardiovasculaire.....68

Figure I.13 : Effets cardioprotecteurs de l'exercice.....75

MATERIELS ET METHODES

Figure II.1: Schématisation du protocole journalier d'exposition au monoxyde de carbone (CO). ppm : particules par million.....	84
Figure II.2: Organisation du protocole d'entraînement et d'exposition au CO.....	85
Figure II.3: Représentation des protocoles expérimentaux des études n°2, n°3.....	89
Figure II.4: Représentation du protocole expérimental de l'étude n°4.....	90
Figure II.5: Exemple d'un tracé de pression obtenu au cours d'un protocole d'ischémie-reperfusion sur cœur isolé perfusé de Langendorff.....	91
Figure II.6: Evaluation de taille de la zone infarctée par colorimétrie et planimétrie. TTC : triphenyl-tetrazolium chloride ; VG : ventricule gauche.....	93
Figure II.7: Représentation des arythmies de reperfusion évaluées dans l'étude n°1. FV : fibrillation ventriculaire.....	94
Figure II.8: Tracés types de variations de longueur des sarcomères et d'imagerie calcique sur cardiomyocyte isolé stimulé électriquement. Représentations des paramètres calculés.....	98
Figure II.9: Schématisation de l'enregistrement du spectre par résonance paramagnétique électronique (RPE) pour identifier l'anion superoxyde par « <i>spin trapping</i> ». CMH : 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine.....	107

RESULTATS

- Figure III.1** : **A** : Représentation type du raccourcissement sarcomérique obtenu sur cardiomyocyte isolé intact stimulé à 0,5 Hz ; **B** : Raccourcissement sarcomérique, exprimé en pourcentage de la variation de longueur des sarcomères. \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 115
- Figure III.2** : **A** : Représentation type du transitoire calcique obtenu sur cardiomyocyte stimulé à 0,5 Hz ; **B** : Calcium diastolique ; **C** : Amplitude du transitoire calcique. \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 116
- Figure III.3** : Evaluation de la cinétique de repompage du calcium d'un cardiomyocyte stimulé à 0,5 Hz. \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 117
- Figure III.4** : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de SERCA-2a. \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 117
- Figure III.5** : **A** : Activité enzymatique myocardique de la SOD ; **B** : Activité enzymatique myocardique de la GPx ; **C** : Activité enzymatique myocardique de la CAT. ns : non significatif ; \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 119
- Figure III.6** : **A** : Représentations des tracés de fibrillations ventriculaires (FV) réversibles et irréversibles lors de la reperfusion; **B** : Incidence des FV totales et irréversibles lors de la reperfusion, exprimée en pourcentage du nombre de rats par groupe expérimental. ns : non significatif ; \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 121
- Figure III.7** : **A** : Taille de la zone infarctée (ZI) après 30 minutes d'ischémie régionale et 2 heures de reperfusion. **B** : Activité de la lactate déshydrogénase (LDH) recueillie dans les effluents coronaires à 5 minutes de reperfusion. \$ p<0,05 CO-Ex vs. Ctrl-Sed ; * p<0,05 CO-Ex vs. CO-Sed. 123

Figure III.8 : Evaluation par western blot de l'expression et du niveau de phosphorylation (Ser¹¹⁷⁷) de la eNOS cardiaque. ns : non significatif ; * p<0,05 Ex vs. Sed..... 128

Figure III.9 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de nNOS. ns: non significatif.
..... 128

Figure III.10 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de iNOS. ns : non significatif.
..... 129

Figure III.11 : Evaluation par western blot du ratio dimère/monomère de eNOS. * p<0,05 Ex vs. Sed.
..... 129

Figure III.12 : Evaluation par western blot de l'expression myocardique de GCH-1. ns : non significatif.
..... 130

Figure III.13 : **A** : Représentation des tracés de pression du ventricule gauche au cours de l'IR. **B** : Pression développée par le ventricule gauche au cours du protocole d'IR chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec de la L-NAME 5 minutes avant et après l'ischémie. * p<0,05 Ex vs.Sed ; # p<0,05 Ex vs. Ex+L-NAME..... 132

Figure III.14 : Taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec de la L-NAME 5 minutes avant et après l'ischémie. * p<0,05 Ex vs.Sed ; # p<0,05 Ex vs. Ex+L-NAME..... 134

Figure III.15 : Capacité antioxydante totale du cœur (réalisée à l'aide d'un kit « *Total Antioxydant Power* », TAP). * p<0,05 Ex vs. Sed..... 136

Figure III.16 : Evaluation par western blot de l'expression et de la phosphorylation de la eNOS (Ser¹¹⁷⁷) à l'état basal (Stab), après 30 minutes d'ischémie (Isch) et après 10 minutes de reperfusion (Reperf). * p<0,05 Ex vs. Sed ; £ p<0,05 Stab vs. Isch. & p<0,05 Isch vs. Reperf..... 137

Figure III.17 : Evaluation par western blot du ratio dimère/monomère de eNOS à l'état basal (Stab), après 30 minutes d'ischémie (Isch) et après 10 minutes de reperfusion (Reperf). * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; £ $p < 0,05$ Stab vs. Isch. 138

Figure III.18 : Evaluation par western blot du ratio dimère/monomère de eNOS chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ 5 minutes avant et après la période d'ischémie. **A** : Valeurs obtenues après 30 minutes d'ischémie ; **B** : Valeurs obtenues après 10 minutes de reperfusion. ns : non significatif ; * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; § $p < 0,05$ Ex vs. Ex+BH₄. 143

Figure III.19 : **A** : Représentation des tracés de pression du ventricule gauche au cours de l'IR. **B** : Pression développée par le ventricule gauche au cours du protocole d'IR chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ 5 minutes avant et après l'ischémie. * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; § $p < 0,05$ Ex vs. Ex+BH₄. 145

Figure III.20 : Taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ 5 minutes avant et après l'ischémie. * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; § $p < 0,05$ Ex vs. Ex+BH₄. 147

Figure III.21 : **A** : Représentation des tracés de pression du ventricule gauche au cours de l'IR. **B** : Pression développée par le ventricule gauche au cours du protocole d'IR chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ lors des 5 premières minutes de reperfusion. * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; § $p < 0,05$ Ex vs. Ex+BH₄ reperf. 149

Figure III.22 : Représentation de la taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec du BH₄ lors des 5 premières minutes de reperfusion. * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; § $p < 0,05$ Ex vs. Ex+BH₄ reperf. 150

Figure III.23 : Production de NO évaluée dans les effluents coronaires recueillis lors des 10 premières minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex perfusés ou non avec de la L-NAME 5 minutes avant et après l'ischémie. ns : non significatif ; * $p < 0,05$ Ex vs. Sed ; # $p < 0,05$ Sed vs. Sed+L-NAME. 152

Figure III.24 : A : Production de RLO dépendante des NOS évaluée par RPE sur des homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex ; **B** : Représentations des spectres RPE de détection d'O₂⁻ d' homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex en présence ou non de L-NAME. * p<0,05 Ex vs.Sed..... 153

Figure III.25 : Quantité de MDA évaluée sur des homogénats de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex. ns : non significatif ; * p<0,05 Ex vs.Sed..... 155

Figure III.26 : A : Evaluation par western blot de la nitrotyrosination protéique de cœurs congelés à 10 minutes de reperfusion chez les rats Sed et les rats Ex ; **B** : Représentation de la nitrotyrosination protéique évaluée par western blot sur un gel polyacrylamide-SDS permettant la détection des protéines de 72 à 170 kDA . * p<0,05 Ex vs.Sed..... 156

Figure III.27 : Evaluation par western blot de l'effet de l'injection d'EPI sur l'expression myocardique de la eNOS et sur la phosphorylation de la eNOS sur la Ser¹¹⁷⁷ chez des rats sédentaires. ns : non significatif ; & p<0,05 EPI vs. Ctrl..... 160

Figure III.28 : Taille de la zone infarctée colorée au TTC après 30 minutes d'ischémie et 2 heures de reperfusion chez les rats sédentaires ayant reçu ou non une administration d'EPI. & p<0,05 EPI vs. Ctrl..... 161

Figure III.29 : Evaluation par western blot de l'effet de l'injection d'EPI sur l'expression et la phosphorylation (Ser¹¹⁷⁷) de eNOS à 10 minutes de reperfusion chez des rats sédentaires. ns : non significatif ; & p<0,05 EPI vs. Ctrl..... 163

Figure III.30 : Evaluation par western blot de l'effet l'injection d'EPI sur le ratio de dimère/monomère de eNOS chez des rats sédentaires à 10 minutes de reperfusion. ns : non significatif..... 163

DISCUSSION

Figure IV.1 : Mécanismes de cardioprotection par l'exercice sur le syndrome d'ischémie-reperfusion. β_3 -AR : récepteur β_3 -adrénergique ; eNOS : nitrique oxyde synthétase endothéliale ; SERCA-2a : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ; Ca^{2+} : calcium ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; O_2^- : anion superoxyde ; NO : monoxyde d'azote ; ONOO $^-$: peroxydinitrite.....178

II. Tableaux

RESULTATS

Tableau III.1 : Evaluation des dérivées minimales (dP/dt min) et maximales (dP/dt max) de pression par rapport au temps après 5 et 30 minutes de reperfusion. Valeurs exprimées en pourcentage des valeurs de stabilisation. * p<0,05 Ex vs.Sed ; # p<0,05 Ex vs. Ex+L-NAME.....133

Tableau III.2 : Débits coronariens au cours de la stabilisation et après 5, 10 et 30 minutes de reperfusion.....133

Tableau III.3 : Evaluation des dérivées minimales (dP/dt min) et maximales (dP/dt max) de pression par rapport au temps après 5 et 30 minutes de reperfusion. Valeurs exprimées en pourcentage des valeurs de stabilisation. * p<0,05 Ex vs.Sed ; § p<0,05 Ex vs. Ex+BH $_4$146

Tableau III.4 Débits coronariens au cours de la stabilisation et après 5, 10 et 30 minutes de reperfusion.....146

Annexes

Article n° 1

Moderate exercise prevents impaired Ca²⁺ handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia- reperfusion

Publié dans :

Am J Physiol Heart Circ Physiol :

Moderate exercise prevents impaired Ca^{2+} handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia-reperfusion

C. Farah,^{1*} G. Meyer,^{1*} L. André,² J. Boissière,¹ S. Gayrard,¹ O. Cazorla,² S. Richard,² F. Boucher,³ S. Tanguy,¹ P. Obert,¹ and C. Reboul¹

¹Research Laboratory EA 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences, Avignon University, Avignon; ²Research Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U637, Cardiovascular Physiopathology, Montpellier1 University, Faculty of Medicine, Montpellier; ³Research Laboratory, Centre National de la Recherche Scientifique UMR5525 Physiologie Respiratoire Expérimentale Théorique et Appliquée-TIMC, Grenoble University Joseph Fourier, Grenoble, France

Submitted 23 August 2010; accepted in final form 29 September 2010

Farah C, Meyer G, André L, Boissière J, Gayrard S, Cazorla O, Richard S, Boucher F, Tanguy S, Obert P, Reboul C. Moderate exercise prevents impaired Ca^{2+} handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H2076–H2081, 2010. First published October 1, 2010; doi:10.1152/ajpheart.00835.2010.—Sustained urban carbon monoxide (CO) exposure exacerbates heart vulnerability to ischemia-reperfusion via deleterious effects on the antioxidant status and Ca^{2+} homeostasis of cardiomyocytes. The aim of this work was to evaluate whether moderate exercise training prevents these effects. Wistar rats were randomly assigned to a control group and to CO groups, living during 4 wk in simulated urban CO pollution (30–100 parts/million, 12 h/day) with (CO-Ex) or sedentary without exercise (CO-Sed). The exercise procedure began 4 wk before CO exposure and was maintained twice a week in standard filtered air during CO exposure. On one set of rats, myocardial ischemia (30 min) and reperfusion (120 min) were performed on isolated perfused rat hearts. On another set of rats, myocardial antioxidant status and Ca^{2+} handling were evaluated following environmental exposure. As a result, exercise training prevented CO-induced myocardial phenotypical changes. Indeed, exercise induced myocardial antioxidant status recovery in CO-exposed rats, which is accompanied by a normalization of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a expression and then of Ca^{2+} handling. Importantly, in CO-exposed rats, the normalization of cardiomyocyte phenotype with moderate exercise was associated with a restored sensitivity of the myocardium to ischemia-reperfusion. Indeed, CO-Ex rats presented a lower infarct size and a significant decrease of reperfusion arrhythmias compared with their sedentary counterparts. To conclude, moderate exercise, by preventing CO-induced Ca^{2+} handling and myocardial antioxidant status alterations, reduces heart vulnerability to ischemia-reperfusion.

carbon monoxide; myocardial infarction; environmental pollution; endurance training; antioxidant status

THE SEVERITY OF myocardial infarction results from a complex interplay between genetic, pathological, and environmental factors (22, 27). Among the environmental factors, numerous epidemiological studies have demonstrated that carbon monoxide (CO) pollution correlated with hospital admissions for cardiovascular diseases (3, 17), as well as cardiovascular mortality (28). We recently reported that a sustained low-level CO exposure, similar to that found in an urban environment,

induced a pathological remodeling of the myocardium (1), rendering the heart more vulnerable to ischemia-reperfusion (I/R) (18). This remodeling involves a marked alteration of enzymatic antioxidant status associated with marked changes in Ca^{2+} handling (1), promoting cardiomyocyte death and severe ventricular arrhythmias (18).

Today, among numerous cardioprotective strategies used to prevent deleterious myocardial remodeling associated with several pathological states and/or to reduce the vulnerability of the heart to acute ischemic events, regular endurance exercise training is reported as one of the most practicable and sustainable methods (2, 7, 11, 25, 26). Although the mechanisms responsible for exercise-induced cardioprotection remain unclear, many studies suggest that increased enzymatic antioxidant status plays an important role (7, 10, 35). In addition, exercise training is also reported to normalize Ca^{2+} homeostasis in the pathological myocardium (29, 32). Therefore, we have hypothesized that regular exercise training started before sustained CO exposure could prevent pathological cardiac remodeling and/or modulate heart vulnerability to I/R.

The aim of this study was to evaluate the potential cardioprotective effects of regular bouts of endurance training in an experimental rat model exposed to simulated sustained urban CO pollution. Especially, we focused on the effects of exercise training on Ca^{2+} handling, myocardial enzymatic antioxidant status alterations, and the consequences on heart vulnerability to I/R. The major results showed that regular bouts of endurance training prevented the pathological cardiac remodeling and the higher vulnerability to I/R of the hearts of rats exposed to chronic CO.

METHODS

All investigations complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, Revised 1996) and with the approval of the French Ministry of Agriculture. All experiments have been approved by the Local Research Ethics Committee (Comité Régional d'Éthique).

Animals

Adult male Wistar rats ($n = 57$; 384 ± 3 g; Charles River) were randomly assigned to three experimental groups: 1) sedentary control group (Ctrl-Sed rats), 2) sedentary CO-exposed group (CO-Sed rats), and 3) exercise-trained CO-exposed group (CO-Ex rats). All experimental groups were maintained on a 12-h:12-h light-dark cycle and provided rat chow and water ad libitum.

* C. Farah and G. Meyer contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Reboul, Research Laboratory, EA 4278, Physiology and Physiopathology of Cardiovascular Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences, Avignon Univ., F-84000 Avignon, France (e-mail: cyril.reboul@univ-avignon.fr).

Exercise Training Protocol

Moderate exercise training protocol was performed on a motor-driven treadmill for 4 wk, 5 days/wk, at a relative work rate corresponding to 50% of maximal aerobic velocity (20 m/min; 40 min/day). During the following 4 wk corresponding to the CO exposure period, to preserve the exercise training benefits, exercise training was maintained in CO-Ex rats on a frequency of 2 days/wk.

CO Exposure

The CO groups were exposed to simulated CO urban pollution for 4 wk, 12 h/day, during the night phase. CO rats were housed in an airtight exposure container, and exposure was performed as follows: 1) during CO exposure, a CO concentration of 30 parts/million (ppm) was maintained in the airtight container and monitored with an aspirative CO analyzer (CHEMGARD Infrared Gas Monitor NEMA 4 Version, MSA), and this initial concentration was completed with five 1-h peaks at 100 ppm CO; and 2) during ambient air exposure,

the animals were placed in the laboratory animal house at a CO concentration of 0 ppm. Throughout this CO exposure period, Ctrl-Sed rats were confined in the laboratory animal house and were subjected to the same restraint as the CO-Sed rats. At the end of the 4 wk of CO exposure, the rats were housed for 24 h in standard filtered air before euthanasia to avoid any acute effects of CO on the myocardium.

Ca²⁺ Handling in Cardiomyocytes

In the first set of rats ($n = 4$ rats/group; 10 myocytes/rat), an evaluation of exercise training and CO exposure on excitation-contraction was performed on single ventricular cardiomyocytes isolated by enzymatic digestion (21). Unloaded cell shortening and Ca²⁺ concentration (Indo-1 dye) were measured using field stimulation (0.5 Hz, 22°C, 1.8 mM external Ca²⁺). Sarcomere length (SL) and fluorescence (405 and 480 nm) were simultaneously recorded (Ion-Optix system, Hilton) (1).

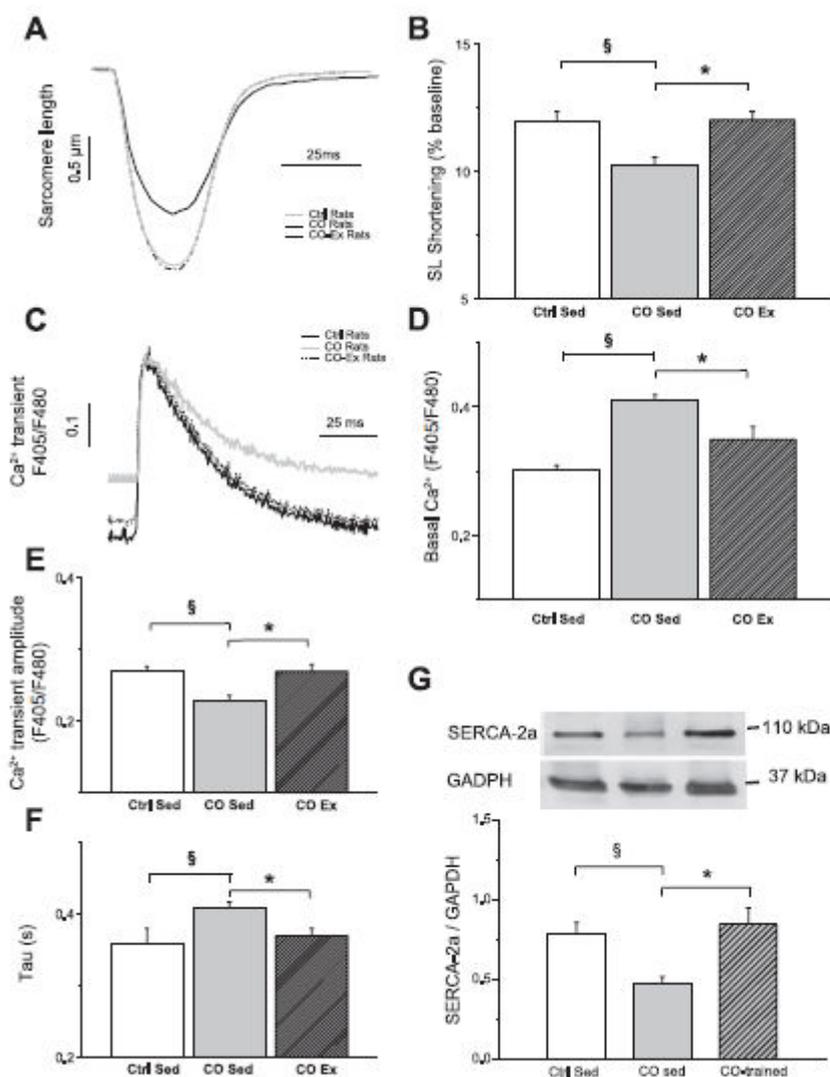
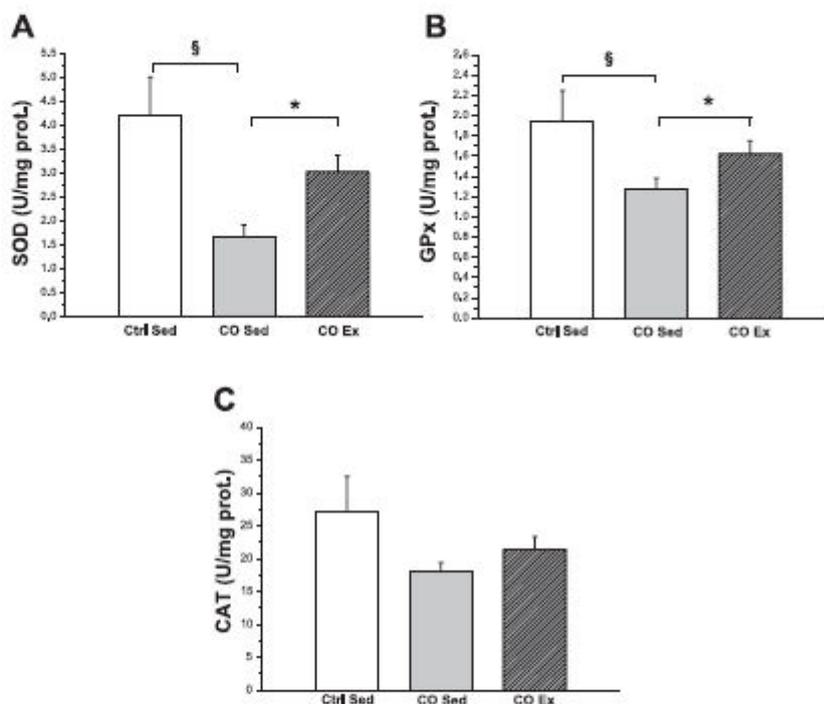


Fig. 1. Effects of exercise training and carbon monoxide (CO) exposure on sarcomere length (SL) shortening and Ca²⁺ handling in cardiomyocytes. *A*: representative contraction of intact cardiomyocytes measured by sarcomere shortening at 0.5 Hz. *B*: amplitude of SL shortening. Data are presented as percentages of baseline. *C*: representative Ca²⁺ transient during cardiomyocyte excitation-contraction. F₄₀₅/F₄₈₀, ratio of fluorescence at 405 to 480 nm. *D*: diastolic intracellular Ca²⁺. *E*: Ca²⁺ transient amplitude. *F*: Ca²⁺ reuptake kinetics (τ). *G*: cardiac expression of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2a). The GAPDH blot (37 kDa) was used as a loading control to normalize SERCA2a protein expression. Data are presented as means \pm SE ($n = 5$ per group, one-way ANOVA). § $P < 0.05$, control (Ctrl)-sedentary (Sed) vs. CO-Sed; * $P < 0.05$, CO-Sed vs. CO-exercise trained (Ex).

H2078

CO POLLUTION AND EXERCISE CARDIOPROTECTION

Fig. 2. Effects of exercise training and CO exposure on myocardial antioxidant enzyme activities. *A*: superoxide dismutase (SOD) activity. *B*: glutathione peroxidase (GPx) activity. *C*: catalase (Cat) activity. Activities are expressed in U/mg of protein (Prot). Data are presented as means \pm SE ($n = 5$ per group, one-way ANOVA). § $P < 0.05$, Ctrl-Sed vs. CO-Sed; * $P < 0.05$, CO-Sed vs. CO-Ex.



Regional Myocardial I/R Protocol on Isolated Perfused Heart

In a second set of rats ($n = 10$ /group), a regional myocardial I/R protocol on an isolated-perfused heart was performed (18). This model was chosen to abrogate the potential effects of CO exposure on hormonal, circulating, and nervous parameters. The coronary occlusion-induced myocardial regional ischemia was maintained for 30 min. Subsequently, the heart was allowed to reperfuse during 120 min. Lactate dehydrogenase (LDH) release and incidence of ventricular fibrillation (VF) was evaluated during the reperfusion period. At the end of the perfusion, the hearts were divided into five slices perpendicular to the apex-base axis and triphenyltetrazolium chloride staining (0.5 mg/ml for 20 min at 37°C) was used to assess myocardial tissue viability and to determine myocardial infarct size. The tissue slices were photographed, and the risk and infarcted areas were then determined using a computer-based system (ImageJ, NIH).

Biochemical Assays

Heart antioxidant enzyme activity. To assess the effects of exercise training and/or CO exposure on the antioxidant capacity, the heart enzymatic antioxidant status was measured in the third set of rats as previously described ($n = 5$ /group) (18). Superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activities were evaluated.

LDH activity in coronary effluents. LDH activity, used as an index of cell membrane damage, was measured in coronary effluents at 5 min of reperfusion. LDH activity was measured spectrophotometrically using an LDH kit (LDH-P, BIOLABO SA, France).

Western blot analysis. Proteins were separated using 4–20% SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane (Protran, Schleichen and Schuele, Dassel, Germany). Membranes were incubated overnight at 4°C with the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2a (SERCA2a) antibody (A010-20, Badrilla, UK), and the levels were expressed relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) content on the same membrane. Immunodetection was carried out using the ECL Plus system (Amersham Pharmacia, Little Chalfont Buckinghamshire, UK).

drogenase (GAPDH) content on the same membrane. Immunodetection was carried out using the ECL Plus system (Amersham Pharmacia, Little Chalfont Buckinghamshire, UK).

Statistics

Data were analyzed using either one-way factorial or repeated-measures ANOVA. When significant interactions were found, a Student-Newman-Keuls test was applied. Binomially distributed variables (such as incidence of VFs) were analyzed using a nonparametric Yates' χ^2 -test (Statview; Adept Scientific, Letchworth, UK). A level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data are expressed as group means or group mean fractions of baseline \pm SE.

RESULTS

Contraction and Ca^{2+} Handling in Single Cells

Chronic exposure to CO pollution decreased SL shortening (Fig. 1, *A* and *B*), increased diastolic cytosolic Ca^{2+} (Fig. 1, *C* and *D*), and decreased the amplitude of the Ca^{2+} transient (Fig. 1, *C* and *E*). In addition, the decay kinetics (τ) of the Ca^{2+} transient were impaired (Fig. 1*F*), which was explained by a decrease in SERCA2a expression in CO rats (Fig. 1*G*). Exercise training prevented both SERCA2a reduction (Fig. 1*G*) and Ca^{2+} -handling alterations (Fig. 1, *D–F*). Exercise training therefore preserved normal SL shortening, which was similar to that of rats living in standard filtered air (Fig. 1, *A* and *B*).

Myocardial Enzymatic Antioxidant Status

After 4 wk of sustained CO exposure, the myocardial enzymatic antioxidant status was depressed. The SOD and GPx activities were reduced in CO-Sed rats compared with Ctrl-Sed

rats (Fig. 2, A and B). Exercise training prevented these deleterious effects since SOD and GPx activities did not differ between CO-Ex rats and Ctrl-Sed rats. In contrast, no effect from CO exposure or exercise training was reported on catalase activity (Fig. 2C).

Infarct Size and Myocardial Cells Death

Cardiac cell death induced by I/R was aggravated by prolonged CO exposure (Fig. 3, A and B). Indeed, infarct size was higher in CO rats than in controls. In addition, LDH release, measured in coronary effluents at the time of postischemic myocardial reperfusion and used as an index of cell membrane damage, was higher in CO-exposed rats than in their counterparts. The promoting effect of CO exposure on myocardial necrosis was fully prevented by regular exercise since no difference in infarct size was observed between CO-Ex and Ctrl-Sed rats (Fig. 3, A and B). Consistently, the same result was obtained regarding the effects of exercise on LDH release during postischemic reperfusion (Fig. 3C).

Myocardial Reperfusion Arrhythmias

Although no difference was observed in the incidence of VF (33%, Ctrl-Sed vs. 50% CO-Sed), chronic CO exposure was responsible for a marked increase in the severity of postisch-

emic reperfusion VF. Indeed, sustained VF (Fig. 3D) occurred in 25% of CO-Sed rats, whereas this phenomenon was not observed in Ctrl-Sed rats (Fig. 3E). Interestingly, the pronounced deleterious effect of CO exposure on the severity of reperfusion arrhythmias was fully prevented by exercise training since no VF was reported in CO-Ex rats (Fig. 3E).

DISCUSSION

The major results of this study are that endurance training prevents the deleterious effects of sustained CO exposure on myocardial antioxidant status, cellular Ca^{2+} handling, and myocardial vulnerability to I/R injury.

CO Exposure and Cardioprotective Effects of Exercise Training

In line with previous reports, including ours, we confirmed here the deleterious effects of simulated urban CO exposure on enzymatic antioxidant status and cardiomyocyte Ca^{2+} handling (1, 4). Low and sustained levels of CO exposure promoted pathological cardiac remodeling with impaired Ca^{2+} handling due to increased diastolic Ca^{2+} , decreased Ca^{2+} transient, and Ca^{2+} reuptake in the sarcoplasmic reticulum (SR) due to reduced SERCA2a expression (1, 4). These changes are related to CO-induced oxidative stress (18, 37)

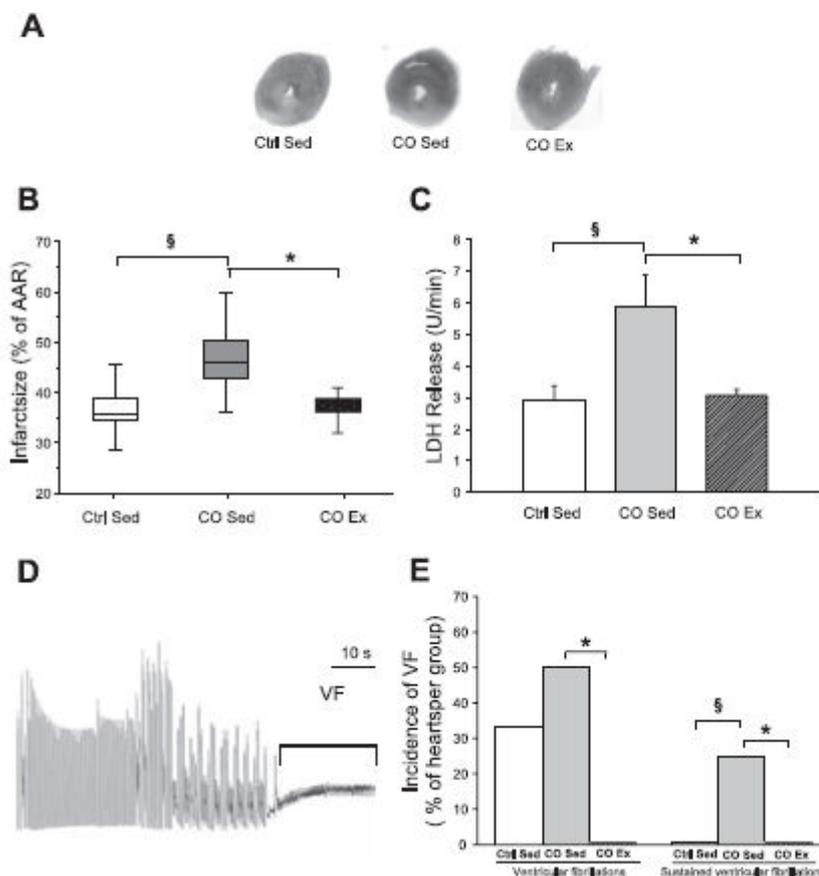


Fig. 3. Effects of exercise training and CO exposure on ischemia-reperfusion-induced cellular death and postischemic ventricular fibrillations (VFs). A: representative sections of area at risk (AAR) and infarct size of rat hearts stained, respectively, with Evans blue and triphenyltetrazolium chloride after 30 min regional ischemia and 120 min reperfusion from isolated heart experiments in each experimental group. B: infarct sizes expressed as percentages of AAR. Data are presented as means \pm SE (Ctrl-Sed, $n = 7$; CO-Sed, $n = 6$; and CO-Ex, $n = 6$; one-way ANOVA). C: LDH activity observed in coronary effluents at 5 min of reperfusion and used as a marker of cell death. Data are presented as means \pm SE (Ctrl-Sed, $n = 9$; CO-Sed, $n = 7$; and CO-Ex, $n = 10$; one-way ANOVA). D: representative plot of VF. E: incidence of VFs occurring during the first 5 min of reperfusion. Data are presented as percentages of rats per experimental group (Ctrl-Sed, $n = 6$; CO-Sed, $n = 8$; and CO-Ex, $n = 9$; nonparametric Yates' χ^2 -test). § $P < 0.05$, Ctrl-Sed vs. CO-Sed; * $P < 0.05$, CO-Sed vs. CO-Ex.

being associated with altered redox (1) and enzymatic antioxidant statuses (1, 18).

One main result of the present study was that moderate exercise training conducted before CO exposure successfully prevented the deleterious effects of CO exposure on myocardial enzymatic antioxidant activities (SOD and GPx). Even if the underlying mechanisms are not fully understood yet, exercise training is well recognized today as one of the most efficient cardioprotective strategies, notably through the enhancement of myocardial antioxidant status (2, 7, 12, 15, 16). Consistently, exercise preserved antioxidant status and, thereby, prevented cytosolic Ca^{2+} overload and depressed Ca^{2+} transient in CO-trained rats, in line with various reports of the beneficial effects of exercise training on Ca^{2+} handling in a pathological population (21, 29, 32). The maintenance of normal SERCA2a expression mainly explained this benefit on Ca^{2+} homeostasis. Although the direct effects of exercise training on SERCA2a expression could not be ruled out (21, 33), our results are consistent with the indirect effects mediated by the normalization of enzymatic antioxidant status on this redox-sensitive protein (8, 20, 31, 34).

Endurance Training and Sensitivity to I/R Consecutive to CO Exposure

We recently reported that a sustained CO exposure increased the vulnerability to I/R (18). Although lower infarct sizes in CO rats were observed in this study compared with the previous one (18), the present work confirms that CO exposure is associated with an increased severity of myocardial I/R injuries, characterized by an exacerbated occurrence of sustained VFs and cardiomyocyte death. These results are in line with the well-reported determinant role of oxidative stress and Ca^{2+} overload in the severity of postischemic reperfusion arrhythmias, cardiac dysfunction, and irreversible cardiomyocyte damages (5, 6, 22, 36). A major result of our study was that endurance training, by preventing CO-induced cellular alterations, fully prevented the worsened sensitivity of CO rats to I/R. This is in accordance with numerous studies supporting the successful cardioprotective effect of exercise training against I/R injuries (2, 7, 11, 25, 26). This beneficial effect has been largely proposed to reflect the improved myocardial enzymatic antioxidant status (7, 9, 25, 35). In our work, the normalization of enzymatic antioxidant activities certainly contributed to decrease the sensitivity of CO rat hearts to I/R. In addition, various studies also reported the preservation of Ca^{2+} homeostasis as being a key factor for improvement in ischemic heart disease tolerance (30). In particular, the functional level of SERCA2a is one of the factors that determines intracellular Ca^{2+} overload following I/R injuries (23, 30). Taken together, our results show that the indirect effects (mediated by antioxidant effects) and/or the direct beneficial effects of exercise on SERCA2a expression play a major role to normalize heart vulnerability to I/R in rats exposed to sustained CO.

Finally, it has to be noted that in this work, no specific effect of low-intensity exercise training was reported in Ctrl-Ex rats compared with Ctrl rats (data not shown). This result is not surprising since it is well known today that high-intensity exercise training is more effective to induce adaptations in healthy rat hearts (13, 14). Therefore, one of the main findings

of the present work is that an exercise training protocol, specifically designed to follow the recommendation of the World Health Organization [30 min, 5 days/wk, at low intensity (33a)] was shown to be efficient in preventing the development of a myocardial vulnerable phenotype in CO-exposed rats.

Taken together, our results demonstrate that regular exercise training mainly prevents the toxicity of prolonged exposure to environmental CO due to urban pollution. These results point out the essential role of CO-induced cellular Ca^{2+} handling and antioxidant status alterations in the higher vulnerability of CO rat myocardium to I/R and the prevention of these alterations by exercise training. Endurance training, recognized as an efficient antioxidant strategy, seems to be a relevant cardioprotective approach capable of preventing higher cardiac vulnerability to ischemic stress. Given that exposure to air pollutants is an important health issue responsible for 800,000 premature deaths worldwide each year and with increases in the risk of mortality from cardiovascular disease by 76% (19), such a workable preventive strategy is very attractive and deserves further interest.

GRANTS

This work was supported by a French National Research Agency grant (COMYOCARD).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

- Andre L, Boissiere J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O, Richard S. Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 587–595, 2010.
- Ascensao A, Ferreira R, Magalhaes J. Exercise-induced cardioprotection—biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 117: 16–30, 2007.
- Burnett RT, Cakmak S, Brook JR, Krewski D. The role of particulate size and chemistry in the association between summertime ambient air pollution and hospitalization for cardiorespiratory diseases. *Environ Health Perspect* 105: 614–620, 1997.
- Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamn S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H, Wisloff U. Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* 20: 635–646, 2008.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655–673, 2000.
- Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, Zweier JL. Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH_4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH_4 . *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15081–15086, 2007.
- French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J* 22: 2862–2871, 2008.
- Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C294–C301, 2003.
- Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL, Powers SK. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med* 37: 1360–1368, 2004.
- Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 34: 800–809, 2003.

11. Kavazis AN. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med* 39: 923–935, 2009.
12. Kavazis AN, McClung JM, Hood DA, Powers SK. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H928–H935, 2008.
13. Kemi OJ, Ellingsen O, Smith GL, Wisloff U. Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes. *Front Biosci* 13: 356–368, 2008.
14. Kemi OJ, Wisloff U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 425–439, 2010.
15. Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 182: 161–169, 2004.
16. Lew H, Quintanilha A. Effects of endurance training and exercise on tissue antioxidative capacity and acetaminophen detoxification. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16: 59–68, 1991.
17. Mann JK, Tager IB, Lurmann F, Segal M, Quesenberry CP Jr, Lugg MM, Shan J, Van Den Eeden SK. Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ Health Perspect* 110: 1247–1252, 2002.
18. Meyer G, Andre L, Tanguy S, Boissiere J, Farah C, Lopez-Lauri F, Gayraud S, Richard S, Boucher F, Cazorla O, Obert P, Reboul C. Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1445–H1453, 2010.
19. Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, Kaufman JD. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* 356: 447–458, 2007.
20. Morris TE, Sulakhe PV. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 22: 37–47, 1997.
21. Mou YA, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. *Cardiovasc Res* 81: 555–564, 2009.
22. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 88: 581–609, 2008.
23. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, Kurabayashi M. Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther* 16: 1026–1032, 2008.
24. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275: R1468–R1477, 1998.
25. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44: 193–201, 2008.
26. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D. Translational cardiovascular medicine (II). Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: new therapeutic options for acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 62: 199–209, 2009.
27. Samoli E, Touloumi G, Schwartz J, Anderson HR, Schindler C, Forsberg B, Vigotti MA, Vonk J, Kosnik M, Skorkovsky J, Katsouyanni K. Short-term effects of carbon monoxide on mortality: an analysis within the APHEA project. *Environ Health Perspect* 115: 1578–1583, 2007.
28. Stolen TO, Hoydal MA, Kemi OJ, Catalucci D, Ceci M, Aasum E, Larsen T, Rolim N, Condorelli G, Smith GL, Wisloff U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca²⁺ control, and SR Ca²⁺ release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. *Circ Res* 105: 527–536, 2009.
29. Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 84: 345–352, 2009.
30. Viner RI, Krainev AG, Williams TD, Schoneich C, Bigelow DJ. Identification of oxidation-sensitive peptides within the cytoplasmic domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochemistry* 36: 7706–7716, 1997.
31. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 54: 162–174, 2002.
32. Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, Ellingsen O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res* 50: 495–508, 2001.
- 33a. World Health Organization/Fédération Internationale de Médecine du Sport Committee on Physical Activity for Health. Exercise for health. *Bull World Health Organ* 73: 135–136, 1995.
34. Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res* 80: 76–81, 1997.
35. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 189: 1699–1706, 1999.
36. Zhao X, Chen YR, He G, Zhang A, Druhan LJ, Strauch AR, Zweier JL. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1541–H1550, 2007.
37. Zuckerbraun BS, Chin BY, Bilban M, d'Avila JC, Rao J, Billiar TR, Otterbein LE. Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* 21: 1099–1106, 2007.

Article n° 2

**Exercise-induced cardioprotection
requires eNOS uncoupling**

Exercise-induced cardioprotection requires eNOS uncoupling.

C. Farah¹, G. Meyer^{1,4,5}, G. Boleat¹, S. Gayraud¹, B. Geny⁴, P. Obert¹, O. Cazorla², S. Tanguy³, C. Reboul^{1*}.

¹, EA 4278, Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Faculty of Sciences, Avignon University, F-84000 Avignon, France.

², INSERM U1046, Université MONTPELLIER1, Université MONTPELLIER2, F-34295 Montpellier, France

³, TIMC PRETA: CNRS UMR 5525, Laboratoire Coeur & Nutrition, Grenoble University Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France.

⁴, EA 3072, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67091 Strasbourg, France

⁵, UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, Faculty of Pharmacy, Strasbourg University, F-67400 Illkirch, France.

***Corresponding Author:**

Cyril Reboul, PhD

Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire

University of Avignon

Faculty of Sciences

33 rue Louis Pasteur

84000 Avignon, France

Ph: +334 90 16 29 33

Fax: +334 90 16 29 01

Email: Cyril.reboul@univ-avignon.fr

Abstract

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is known as playing a key role in the modulation of heart vulnerability to IR. Exercise training is recognized as an efficient strategy to protect the myocardium against myocardial ischemia-reperfusion (IR). However, despite eNOS is a well-known target of exercise, its role in exercise-induced cardioprotection remains unknown. The aim of this study was then to investigate whether the modulation of eNOS activation during IR could participate to exercise-induced lower heart vulnerability to IR. To address this issue, sedentary (Sed) or exercised (Ex) rat hearts were submitted to IR, in presence or not of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or tetrahydrobiopterin (BH₄), on Langendorff heart apparatus. Increased eNOS-P^{Ser1177} at the end of the training period was associated with cardioprotection, which was abolished by L-NAME. Such cardioprotection was characterized by reduced eNOS-P^{Ser1177} and eNOS uncoupling at early reperfusion. This was responsible for a decreased NOS-dependent NO synthesis and increased of NOS-dependent O₂⁻. Nonetheless, since exercise improved heart antioxidant capacity to scavenge O₂⁻, such eNOS uncoupling was associated with reduced malondialdehyde and protein nitrotyrosination, suggesting lesser nitro-oxidative stress in Ex rat hearts during early reperfusion. These results suggest that eNOS uncoupling associated with improved myocardial antioxidant capacity of the heart, by reducing NO availability, limit the reaction between NO and O₂⁻ to form the potent cytotoxic ONOO⁻. Importantly, in Ex hearts, normalization of eNOS dimer/monomer ratio with BH₄ totally abolished exercise-induced cardioprotection. Therefore, eNOS uncoupling during IR is required for exercise-induced myocardial cardioprotection.

Key Words: nitro-oxidative stress, training, myocardial infarction, eNOS monomerization.

Introduction

Exercise training is a widely recognized way to protect the heart against ischemia-reperfusion (IR) injuries [9, 14, 15, 26]. Although the understanding of physiological mechanisms allowing such complex cardioprotection could provide new biological targets to reduce heart vulnerability to IR, mechanisms responsible for this remain still largely unclear. To date, exercise-induced decrease of heart sensitivity to IR is principally explained by an improvement of myocardial enzymatic antioxidant status [17, 26, 28] and calcium homeostasis [12, 14, 15, 35]. Beneficial effects of exercise training on cardiovascular health are also well known to be related to enhanced endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression [22, 29] and/or phosphorylation [16, 38, 39], increasing then nitric oxide (NO) bioavailability. In addition, eNOS is recognized as a major trigger to reduce heart vulnerability to IR [13, 18, 30]. Despite such evidence that eNOS could play a major role in exercise-induced cardioprotection, only one study [5] recently demonstrated that increase of eNOS phosphorylation at serine¹¹⁷⁷ (Ser¹¹⁷⁷) by exercise is an essential trigger of exercise-induced cardioprotection. However mechanisms responsible for such exercise-induced eNOS-dependent cardioprotection were not investigated during IR.

eNOS is a critical homodimeric enzyme which, under physiological conditions, consumes NADPH to synthesize NO and L-citrulline from L-arginine and oxygen. The dimer stability of eNOS is allowed by the presence of the essential cofactor tetrahydrobiopterin (BH₄). In pathophysiological conditions, depletion or oxidation of BH₄ can result in eNOS uncoupling which then generates superoxide anion (O₂⁻) instead of NO. In addition, O₂⁻ can react with local NO to produce the potent cytotoxic peroxynitrite (ONOO⁻) [24]. Thus, eNOS uncoupling is clearly recognized to play a major role in myocardial IR injuries by increasing ROS production and limiting NO availability [19]. In addition, numerous studies demonstrated attenuation of heart sensitivity to IR when eNOS-NO pathway was improved by strategies such as eNOS overexpression [4, 11], NO administration [31] or BH₄ supplementation [33, 37].

Accordingly, we hypothesized that eNOS could play a major role in exercise-induced cardioprotection notably by improving eNOS coupling state during IR. To address this issue, we evaluated the effects of exercise training on eNOS phosphorylation and dimerization during cardiac IR. Because, we surprisingly found that eNOS was markedly uncoupled consecutive to IR in exercised rat hearts, we next evaluated whether such eNOS uncoupling could contribute to exercise-induced cardioprotection. The major result of the present work is that exercise-

induced cardioprotection is mainly dependent of eNOS uncoupling during early reperfusion, since keeping eNOS coupled during IR with BH₄ infusion totally blunted exercise-induced cardioprotection.

Methods

Detailed information on the methodology is available on the online data supplement.

Animals and myocardial IR protocol

All investigations complied with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, revised 1996) and with the approval of the French Ministry of Agriculture. All experiments have been approved by the local research ethics committee (Comité Régional d'Ethique, n°: 84.004).

Wistar male rats (Charles River Laboratories, France) aged of 12 weeks (382 ± 38 g) were randomly assigned to sedentary (Sed) or exercised (Ex) groups. Ex group was trained on a motor driven treadmill for 5 weeks, 5 days/week at 70 % of maximal aerobic velocity (25 m/min; 45 min/day). 24 hours after the training period, hearts were mounted on an isolated Langendorff apparatus as previously described [12]. Briefly, animals were anaesthetized (sodium pentobarbital, 100 mg/kg, i.p.), a thoracotomy was performed, and hearts were retrogradely perfused on a Langendorff apparatus. Hearts were paced at a rate of 300 beats/min (Low voltage stimulator, BSL MP35 SS58L, 3V) and a non-compliant balloon was inserted into the left ventricle (LV) to achieve pressure curve. Then, global no-flow ischemia was performed during 30 min followed by 120 min of reperfusion. All along the IR procedure cardiac functional parameters, such as LV developed pressure (LVDP) were recorded (MP35, BioPac System Inc) and coronary effluents were collected to evaluate coronary blood flow. At the end of the protocol, a tryphenyltetrazolium-chloride (TTC) staining procedure was performed in order to assess infarct size.

Experimental protocol

To evaluate the effects of exercise on eNOS, hearts were collected 24 hours after the training period and frozen in liquid nitrogen for biochemical measurements. To assess the involvement of eNOS in exercise-induced cardioprotection, some hearts were perfused 5 min before and after ischemia with either a NOS inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 μ M) (Sed+L-NAME; Ex+L-NAME) or a eNOS coupling agent, BH₄ (50 μ M at tissue level) (Sed+BH₄; Ex+BH₄). In some hearts, BH₄ was perfused only during the 5 first minutes of reperfusion. At the end of the ischemic period (I-30) or at 10 min of reperfusion (R-10) hearts were

quickly removed, the right ventricle was cleaned up, and LV tissues were frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis. The experimental procedure is summarized in Fig. 1.

Biochemical assays

Nitrite, nitrate analysis

NO myocardial release was measured in coronary effluents by the Griess reaction, using an assay kit of nitrite/nitrate evaluation (QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit; BioAssay Systems).

Western blot analysis

Proteins from LV homogenates were separated with a polyacrylamide-SDS gel and transferred onto a PVDF. Membranes were probed with primary antibodies overnight at 4°C in 10% milk or 3% bovine serum albumin Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20. Primary antibodies used in this study are the following: anti-mouse eNOS (1:1000; BD Transduction Laboratory), anti-mouse eNOS-P^{Ser1177} (1:1000; BD Transduction Laboratory), anti-rabbit GAPDH (1:3000; Santa Cruz), anti-rabbit nitrotyrosine (1:20000; Millipore Corporation). Immunodetection was carried out using ECL or ECL Plus system (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrat; Thermo Scientific; Luminata™ Forte Western HRP substrate; Millipore Corporation, respectively) and then exposed to X-ray film for revelation. Protein content was expressed relative to GAPDH content on the same membrane. To evaluate the eNOS dimer/monomer ratio a detection of SDS-resistant eNOS dimers was performed using non denaturing conditions, and low temperature SDS-PAGE.

Measurement of lipid peroxydation

Malondialdehyde (MDA), an end-product of lipid peroxidation, was measured by dot blot analysis as previously described [1]. Briefly homogenized tissue were dotted onto a nitrocellulose membrane and incubated with primary antibody anti-rabbit MDA (1:500; Millipore Corporation) overnight at 4°C. Signal was revealed as described for western blotting. MDA content was expressed relative to Ponceau S staining.

Measurement of myocardial total antioxidant power

To evaluate total antioxidant capacity of the heart, tissues were homogenized in PBS buffer (NaCl : 137, KCl : 24; Na₂HPO₄ : 19 ; KH₂OP₄ : 18 ; in mM; pH = 7) at 4°C. Homogenates were centrifuged at 3.000 g for 10 min

at 4°C. Myocardial total antioxidant power was determined with a TAP kit (Total Antioxydant Power Kit (TAO2); Oxford Biomedical Research). The total antioxidant capacity of the heart was expressed in mM of Trolox.

Quantification of anion superoxide by EPR

ROS production was measured by electron paramagnetic resonance (EPR) in LV homogenates. Briefly, homogenates were treated with 1 mM 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine (CMH) solution (1:1 v/v), put in the EPR glass capillary tube (Noxygen Science Transfer & Diagnostics, Germany), and were placed inside the e-scan spectrometer (Bruker, Germany) for data acquisition. The procedure was then repeated on the same samples but in presence of L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ M). The difference between the two conditions gave the NOS-dependent ROS production. The acquisition EPR parameters were: microwave frequency = 9.652 GHz; modulation frequency= 86 kHz; modulation amplitude= 0,01 G; center field= 3494.9 G, sweep width: 300 G, microwave power: 1.0 mW, number of scans: 10; receiver gain: $2 \cdot 10^{-1}$. Sample temperature was kept at 37°C by the Temperature & Gas Controller “Bio III” unit, interfaced to the spectrometer. The radicals generated by the reaction of the probe with the tissue radicals were acquired and the spectra sequentially recorded for about 5 min in order to calculate the ROS production rate. ROS production was normalized to the protein content of each sample and then expressed in ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) [3].

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. For multiple experimental conditions comparison, ANOVA or repeated ANOVA were used, followed by PLSD Fischer post-hoc test. For two mean values difference analysis, Student t-test was used. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Implication of eNOS in exercise-induced cardioprotection against IR

Exercise training is classically reported to alter myocardial NO synthesis, mainly by increasing eNOS expression [20] or phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ [5, 16]. In our model, exercise training had no effect on eNOS content (Fig. 2A) but significantly increased the level of eNOS-P^{Ser1177} (Fig. 2A). In addition, exercise training increased the ratio of eNOS dimer/monomer suggesting an enhancement of the coupling state of eNOS (Fig. 2B). In accordance with previous studies [5, 8], no effect of our model was observed on both nNOS and iNOS expressions (Suppl. datas Fig. 2A, B) [5, 8]. Then, we investigated whether the effects of exercise on eNOS could impact heart vulnerability to IR. As expected, our model of exercise protected the heart against IR as indicated by the higher recovery of post-ischemic LVDP (Fig. 2C, D) and the smaller infarct size (Fig. 2E, F) in exercised rats compared with sedentary animals. Importantly, the cardioprotective effect of exercise during IR was totally blunted by perfusing the heart with the NOS inhibitor L-NAME, whereas no effect of the drug was observed in sedentary hearts. The NOS-dependent effects of exercise during IR were obvious regarding the LVDP after reperfusion and the infarct size, since in presence of L-NAME, both reached values similar to sedentary animals (Fig. 2C, D, E, F). Thus, these results confirmed that cardioprotective effects of exercise against IR are NOS-dependent and may be mediated by eNOS since nNOS and iNOS were not altered by exercise. An interesting point is that neither exercise, nor L-NAME perfusion, had effect on coronary blood flow (Table 1).

How eNOS contributes to exercise-induced cardioprotected myocardium

Time course of eNOS phosphorylation and coupling during IR

We next explored the effects of exercise training on eNOS activation status during ischemia and reperfusion. Ischemia (30 min) reduced the level of eNOS-P^{Ser1177} in both sedentary and exercised hearts but to a larger extent in exercised group (Sed: -57 % vs. Ex: -88 %; Fig. 3A). Interestingly, after 10 min of reperfusion eNOS-P^{Ser1177} was restored to the baseline level in sedentary animals but not in exercised hearts. Then, whereas eNOS-P^{Ser1177} was higher in exercised hearts before ischemia, the level of eNOS-P^{Ser1177} became obviously lower during

ischemia and reperfusion in this group compared to sedentary ones (Fig. 3A). All along IR, no modification of eNOS expression was reported in both Sed and Ex hearts (Fig. 3A).

Numerous studies have previously demonstrated the major role of eNOS uncoupling in IR injuries since uncoupled eNOS produces O_2^- instead of NO [7, 21]. Thus we postulated that exercise could limit eNOS uncoupling which could contribute to protect the myocardium during IR. To test this hypothesis, we evaluated the coupling state of eNOS by measuring the eNOS dimer/monomer ratio during IR. Ischemia decreased by about 51 % eNOS dimer/monomer ratio in both groups, the ratio remained then higher in exercised hearts compared with sedentary ones (Fig. 3B). After early reperfusion, while the ratio of eNOS dimer/monomer was restored to the baseline level in sedentary hearts, surprisingly eNOS uncoupling was exacerbated in exercised hearts (Fig. 3B). Consequently, after reperfusion eNOS dimer/monomer ratio was significantly lower in Ex hearts compared to Sed ones (Fig. 3B). Therefore, unexpectedly, a major result of this study is that exercise-induced cardioprotection is associated with eNOS uncoupling during early reperfusion.

NO and nitro-oxidative stress during reperfusion

eNOS uncoupling is classically reported to reduce NO synthesis and increase ROS production [36]. We measured the amount of NO released in the effluents by the hearts during the first 10 min of reperfusion. Exercised hearts released less NO than sedentary hearts during early reperfusion (Fig. 4A). When the hearts were pre-incubated with L-NAME, the difference of NO release between groups disappeared due to a reduced NO production only in sedentary hearts (Fig. 4A). Taken together, these results suggest that NO synthesis during early reperfusion in exercised hearts was mainly NOS-independent.

We also measured the NOS-dependent ROS production by EPR spin trapping. The EPR spectra of O_2^- detection were measured in sedentary and exercised heart tissue homogenates in presence or not of L-NAME. The difference between both conditions gave the NOS-dependent ROS production. In our model, eNOS uncoupling in Ex hearts after 10 min of reperfusion was associated with an increased NOS-dependent ROS production compared with Sed hearts at the same time.

Next we explored the consequences of such eNOS uncoupling on nitro-oxidative stress during early reperfusion. First, we measured the content of MDA, an end-product of lipid peroxidation classically used to evaluate nitro-oxidative stress cell damages (Fig. 4C). Exercised hearts had lower MDA content than sedentary hearts after

reperfusion. Notably, this lower myocardial nitro-oxidative stress injury was associated to an increase of heart TAP that has been measured in the myocardium of Ex hearts (Fig. 4D). Next we measured by Western blotting the amount of protein nitrotyrosination, an index of peroxynitrite-induced nitro-oxidative stress, itself derived from the reaction between NO and $O_2^{\cdot-}$. The amount of protein nitrotyrosination at early reperfusion was lower in exercised hearts compared with sedentary ones (Fig. 5E, F), suggesting that in Ex hearts the formation of $ONOO^-$ was reduced during early reperfusion.

Role of eNOS uncoupling in exercise-induced cardioprotection.

Then, to test whether this unexpected eNOS uncoupling during early reperfusion contributes to exercise-induced cardioprotection, we perfused hearts with BH_4 before ischemia and during early reperfusion or during reperfusion only. Treatment with BH_4 increased eNOS dimer/monomer ratio at the end of the ischemic period (Fig. 5A) and at early reperfusion compared with non-treated exercised hearts (Fig. 5B). At the end of the ischemic period eNOS dimer/monomer ratio was significantly increased in BH_4 -treated exercised hearts compared to sedentary hearts (Fig. 5A), and noteworthy the eNOS dimer/monomer ratio was similar between both groups at 10 min of reperfusion (Fig. 5B). A main result of our study is that BH_4 perfusion during ischemia and reperfusion (Fig. 5) or during reperfusion only (Suppl. datas Fig. 3), which resulted in an increased eNOS dimer/monomer ratio, was responsible for a total loss of cardioprotection in Ex hearts, as indexed by post-ischemia LVDP recovery (Fig. 5C) and infarct size (Fig. 5D). No effect of BH_4 was observed in Sed hearts. These data mainly suggest that exercise-induced cardioprotection requires eNOS uncoupling at early reperfusion.

Discussion

eNOS is a well known target of exercise training [16, 29, 39] and is recognized as a main trigger of reduced heart vulnerability to IR [4, 13]. However, today only one work was interested by its implication in exercise-induced cardioprotection [5] and no study investigated how exercise training modulates eNOS activation state during IR, and by this way could protect the myocardium. In the current study, we confirmed that i) eNOS is a main trigger of exercise-induced cardioprotection, and ii) such cardioprotection, contrary to our initial hypothesis, requires eNOS uncoupling during early reperfusion.

First, in accordance with previous works [5, 16, 38] we confirmed that exercise training increases eNOS-P^{Ser1177}. We also observed in the present work that exercise increases eNOS coupling state. Increased eNOS-P^{Ser1177} was previously described as being an efficient way to protect the myocardium [2] and more particularly was recently demonstrated as an essential trigger of exercise-induced cardioprotection [5]. Accordingly, we showed that eNOS plays a major role in exercise-induced cardioprotection since eNOS inhibition by L-NAME during IR totally blunted the protective effects of exercise training on heart sensitivity to IR, whereas no effect of L-NAME was observed in Sed hearts. However, how the modulations of eNOS phosphorylation and coupling during IR play a part in such cardioprotection had never been challenged.

In the present work, we reported that increased eNOS-P^{Ser1177} after an exercise training period resulted yet in a marked uncoupling of the enzyme during early reperfusion. Considering that it is largely recognized that increased eNOS coupling has beneficial consequences in pathological states [21, 23, 32] and that exercise is recognized as an efficient strategy to protect the myocardium [12, 26, 27, 35], eNOS uncoupling in exercised myocardium during reperfusion was unexpected. Then to evaluate whether this phenomenon could play a role in exercise-induced cardioprotection or was only a collateral damage of reperfusion without consequences on heart vulnerability to IR, we perfused hearts with BH₄. An essential point of this work is that pharmacological maintenance of eNOS coupling in Ex hearts with BH₄, perfused during IR or during reperfusion only (Suppl. datas Fig. 3), was associated with a total loss of exercised-induced cardioprotection. This was obvious regarding infarct size, as well as myocardial function. This result clearly showed that eNOS uncoupling was required in exercise-induced lower heart sensitivity to IR.

In our work, ischemia was responsible for eNOS uncoupling in a similar proportion in both Sed and Ex hearts. Various durations of ischemia show a time-dependent decrease in BH₄ levels that triggers eNOS uncoupling [10]. On another hand, recently, Chen et al. [6] proposed that eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ could favor eNOS uncoupling during stress, which could notably be obvious in the post-ischemic heart. To test the validity of this hypothesis in our model, we used a single intravenous dose of epinephrine in sedentary rats to rapidly increase, in a β -adrenergic receptors dependent manner, the phosphorylation of eNOS on Ser¹¹⁷⁷, mimicking then the effects of exercise on eNOS pathway [5] (Suppl. datas Fig. 1). Such pharmacological enhancement of eNOS-P^{Ser1177} had no effect on eNOS coupling during early reperfusion, suggesting that eNOS uncoupling at reperfusion is an exercise-dependent mechanism, and that the level of eNOS-P^{Ser1177} before IR was not implied in this phenomenon (Suppl. datas Fig. 4A, C). Then, how exercise decreased eNOS coupling at early reperfusion remains to be investigated. In addition, β -adrenergic receptors dependent increase of eNOS-P^{Ser1177} performed on sedentary animals was previously reported to reduce heart sensitivity to IR [2], which is also obvious in our work (Suppl. datas Fig. 4 B). Nonetheless, we can note that increased eNOS-P^{Ser1177} induced by epinephrine was maintained at early reperfusion (Suppl. datas Fig. 4 D) whereas it was clearly reduced in exercised hearts. Taken together, these results mainly suggest that eNOS uncoupling and decreased eNOS-P^{Ser1177} at early reperfusion constitute specific exercise-dependent mechanisms, and that catecholamine-dependent increasing of eNOS-P^{Ser1177} was not sufficient to mimic them.

It has been previously shown that eNOS uncoupling increases O₂⁻ production with a subsequent decrease of NO [19]. In our model, eNOS uncoupling was consistently associated with a decrease in NO synthesis during the first minutes of reperfusion. Moreover, we reported here that NO production was mainly independent of NOS in Ex hearts, whereas it was not the case in Sed ones. Indeed, eNOS inhibition by L-NAME markedly reduced NO synthesis in sedentary group, whereas no effect was observed in exercised one. Since increased NO metabolites (nitrites and nitrosothiols) storage by exercise has been previously shown to play a major role in exercise-induced reduced heart vulnerability to IR [5], we can postulate that an eNOS-independent source of NO might be involved to maintain a requisite NO bioavailability during post-ischemic reperfusion despite eNOS uncoupling. eNOS uncoupling observed in Ex hearts during early reperfusion was also associated with a subsequent increase of eNOS-dependent O₂⁻ production. However, as exercise training is classically associated with an improved antioxidant capacity [14, 17], which is also obvious in our work, lipid peroxidation, an index of oxidative stress-

induced cellular damages, was significantly lower in Ex hearts compared to Sed ones. In pathological states, NOS-derived O_2^- reacts with local NO to produce the potent cytotoxic $ONOO^-$ [24], identified as a major culprit in cardiac IR-injury [34, 40]. In our work, eNOS uncoupling, reducing then NO synthesis during IR and increasing ROS production, was yet associated with an improved total antioxidant capacity of the heart. Interestingly, such cardiac phenotype was associated with a reduction of protein nitrotyrosination, suggesting that $ONOO^-$ formation was reduced in Ex hearts during IR. Altogether, these results suggest that in exercise-induced cardioprotection, both increased antioxidant capacity buffering ROS and eNOS uncoupling may contribute to prevent the reaction between NO and O_2^- to form $ONOO^-$. In addition, increased eNOS-P^{Ser1177} which normally enhanced eNOS-derived NO production, could increase eNOS-derived O_2^- production when eNOS is uncoupled [6]. Therefore, decreased eNOS-P^{Ser1177} observed during IR in Ex rat hearts could be beneficial by limiting the amount of eNOS-dependent ROS production.

Finally, because, the inhibition of eNOS by L-NAME totally blunted the cardioprotective effects of exercise, we cannot ignore the potential contribution of eNOS-dependent ROS production in the activation of classical ROS-dependent anti-apoptotic pathway [25], however further studies will be needed to investigate it.

In conclusion, we have shown here that heart preconditioning by exercise is not the result of a simple increase of eNOS-P^{Ser1177} by a catecholamine-dependent pathway but requires a complex interplay between NO metabolites storage, heart antioxidant capacity, and as reported in the present work eNOS uncoupling at early stage of reperfusion. Specially, we have shown in this study that eNOS uncoupling during early reperfusion contributes to prevent the reaction between NO and O_2^- to form the potent cytotoxic $ONOO^-$ and constitutes then an essential trigger of exercise-induced cardioprotection (Fig. 6). Even if more researches are needed to better understand eNOS-dependent protective pathway involved in such cardioprotection, this novel approach opens new perspectives on the controversial role of eNOS-NO pathway in cardiac health. Our work might offer a new paradigm of an efficient and nevertheless misunderstood strategy to protect the myocardium against IR, the exercise.

References

1. André L, Gouzi F, Thireau J, Meyer G, Boissiere J, Delage M, Abdellaoui A, Feillet-Coudray C, Fouret G, Cristol JP, Lacampagne A, Obert P, Reboul C, Fauconnier J, Hayot M, Richard S, Cazorla O (2011) Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Res Cardiol* 106:1235-1246
2. Aragon JP, Condit ME, Bhushan S, Predmore BL, Patel SS, Grinsfelder DB, Gundewar S, Jha S, Calvert JW, Barouch LA, Lavu M, Wright HM, Lefer DJ (2011) Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. *J Am Coll Cardiol* 58:2683-2691
3. Bouitbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B, Zoll J (2012) Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 33:1397-1407
4. Brunner F, Maier R, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B (2003) Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 57:55-62
5. Calvert JW, Condit ME, Aragon JP, Nicholson CK, Moody BF, Hood RL, Sindler AL, Gundewar S, Seals DR, Barouch LA, Lefer DJ (2011) Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res* 108:1448-1458
6. Chen CA, Druhan LJ, Varadharaj S, Chen YR, Zweier JL (2008) Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem* 283:27038-27047
7. Crabtree MJ, Tatham AL, Al-Wakeel Y, Warrick N, Hale AB, Cai S, Channon KM, Alp NJ (2009) Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J Biol Chem* 284:1136-1144
8. de Waard MC, van Haperen R, Soullie T, Tempel D, de Crom R, Duncker DJ (2010) Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression. *J Mol Cell Cardiol* 48:1041-1049
9. Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, Naito H (2001) Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol* 91:2205-2212
10. Dumitrescu C, Biondi R, Xia Y, Cardounel AJ, Druhan LJ, Ambrosio G, Zweier JL (2007) Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15081-15086
11. Elrod JW, Greer JJ, Bryan NS, Langston W, Szot JF, Gebregzlabher H, Janssens S, Feelisch M, Lefer DJ (2006) Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1517-1523
12. Farah C, Meyer G, Andre L, Boissiere J, Gayrard S, Cazorla O, Richard S, Boucher F, Tanguy S, Obert P, Reboul C (2010) Moderate exercise prevents impaired Ca²⁺ handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H2076-2081
13. Frantz S, Adamek A, Fraccarollo D, Tillmanns J, Widder JD, Dienesch C, Schafer A, Podolskaya A, Held M, Ruetten H, Ertl G, Bauersachs J (2009) The eNOS enhancer AVE 9488: a novel cardioprotectant against ischemia reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 104:773-779

14. French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK (2008) Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J* 22:2862-2871
15. French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, Powers SK (2006) Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H128-136
16. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 107:3152-3158
17. Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK (2003) Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 34:800-809
18. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, van Haperen R, de Crom R, Kawashima S, Yokoyama M, Lefer DJ (2004) Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H276-282
19. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201-1209
20. Lauer N, Suvorava T, Ruther U, Jacob R, Meyer W, Harrison DG, Kojda G (2005) Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res* 65:254-262
21. Masano T, Kawashima S, Toh R, Satomi-Kobayashi S, Shinohara M, Takaya T, Sasaki N, Takeda M, Tawa H, Yamashita T, Yokoyama M, Hirata K (2008) Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats: the possible role of oxidative stress caused by uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Circ J* 72:1512-1519
22. McAllister RM, Newcomer SC, Laughlin MH (2008) Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Appl Physiol Nutr Metab* 33:173-178
23. Moens AL, Kass DA (2006) Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2439-2444
24. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424
25. Pagliaro P, Moro F, Tullio F, Perrelli MG, Penna C (2011) Cardioprotective pathways during reperfusion: focus on redox signaling and other modalities of cell signaling. *Antioxid Redox Signal* 14:833-850
26. Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, Shanely RA, Jessup J (1998) Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol* 275:R1468-1477
27. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN (2008) Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 44:193-201
28. Ramires PR, Ji LL (2001) Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H679-688
29. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH (1994) Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74:349-353
30. Szelid Z, Pokreisz P, Liu X, Vermeersch P, Marsboom G, Gillijns H, Pellens M, Verbeken E, Van de Werf F, Collen D, Janssens SP (2010) Cardiospecific nitric oxide synthase 3 gene transfer protects against myocardial reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 105:169-179

31. Takano H, Tang XL, Qiu Y, Guo Y, French BA, Bolli R (1998) Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res* 83:73-84
32. Tiefenbacher CP, Bleeke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kubler W (2000) Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 102:2172-2179
33. Verma S, Maitland A, Weisel RD, Fedak PW, Pomroy NC, Li SH, Mickle DA, Li RK, Rao V (2002) Novel cardioprotective effects of tetrahydrobiopterin after anoxia and reoxygenation: Identifying cellular targets for pharmacologic manipulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123:1074-1083
34. Wang P, Zweier JL (1996) Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 271:29223-29230
35. Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O (2002) Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 54:162-174
36. Xia Y (2007) Superoxide generation from nitric oxide synthases. *Antioxid Redox Signal* 9:1773-1778
37. Yamashiro S, Noguchi K, Matsuzaki T, Miyagi K, Nakasone J, Sakanashi M, Koja K (2002) Beneficial effect of tetrahydrobiopterin on ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124:775-784
38. Zhang QJ, McMillin SL, Tanner JM, Palionyte M, Abel ED, Symons JD (2009) Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol* 587:3911-3920
39. Zhou M, Widmer RJ, Xie W, Jimmy Widmer A, Miller MW, Schroeder F, Parker JL, Heaps CL (2010) Effects of exercise training on cellular mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation in coronary arteries after chronic occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:H1857-1869
40. Zweier JL, Fertmann J, Wei G (2001) Nitric oxide and peroxynitrite in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal* 3:11-22

Table 1. Evaluation of coronary blood flow of each experimental group calculated from coronary effluents collected at end-stabilization, 5, 10 and 30 minutes of reperfusion.

	Coronary blood flow (ml/min)			
	Stabilization	5' reperf.	10' reperf.	30' reperf.
Sed	13,18 ± 0,25	5,67 ± 0,35	6,60 ± 0,36	5,55 ± 0,41
Ex	13,31 ± 0,50	5,20 ± 0,34	5,88 ± 0,41	5,20 ± 0,19
Sed+L-NAME	--	6,47 ± 0,59	7,25 ± 0,61	5,58 ± 0,46
Ex+L-NAME	--	4,81 ± 0,37	5,84 ± 0,21	5,23 ± 0,28
Sed+BH ₄	--	6,14 ± 0,56	6,58 ± 0,39	5,89 ± 0,37
Ex+BH ₄	--	5,95 ± 0,57	6,63 ± 0,56	5,64 ± 0,38

Values are presented as mean ± SEM.

Figure legends

Fig.1 Schematic illustration of the experimental designs used in all groups. L-NAME: N-nitro-L-arginine methyl ester; BH₄: tetrahydrobiopterin. L-NAME marks indicate the time points of drug perfusion 5 min before and after the ischemic period during the Langendorff heart IR procedure. BH₄ marks indicate the time points of drug perfusion 5 min before and/or after the ischemic period during the Langendorff heart IR procedure

Fig.2 Implication of eNOS in exercise-induced cardioprotection. **A:** Effects of exercise on eNOS expression and eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ analyzed by western blot performed on sedentary (Sed) and exercised (Ex) rat hearts. eNOS is expressed relative to GAPDH content, and eNOS-P^{ser1177} is expressed relative to eNOS total content. **B:** Effect of exercise on eNOS dimer/monomer ratio analyzed by the detection of SDS-resistant eNOS dimers on low temperature SDS-PAGE performed on sedentary and exercised rat hearts. **C :** Illustrations of left ventricular (LV) pressure traces of isolated Langendorff hearts of sedentary and exercise groups, perfused or not with L-NAME during last 5 min of stabilization and 5 early minutes of reperfusion, and submitted to 30 min of total global ischemia followed by reperfusion. **D:** Left ventricular developed pressure (LVDP) on isolated Langendorff hearts of sedentary and exercised groups, perfused or not with L-NAME, submitted to the IR procedure. LVDP is expressed in percentage of baseline. **E:** Representative sections of infarct size of hearts from each experimental group stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC) after 30 min of total global ischemia and 120 min of reperfusion. **F:** Infarct size of hearts from each experimental group, expressed in percentage of left ventricular section area. Values are presented as mean ± SEM. * p<0.05 vs. sedentary group; # p<0.05 vs. homolog group treated with L-NAME.

Fig.3 Reduced eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ and eNOS coupling state during ischemia-reperfusion in exercised hearts. **A:** Time course of eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ (eNOS-P^{Ser1177}) during IR (baseline = stabilization; I-30 = after 30 min of ischemia; R-10 = after 10 min of reperfusion) analyzed by western blot performed on sedentary (Sed) and exercised (Ex) rat hearts. eNOS is expressed relative to GAPDH content, and eNOS-P^{ser1177} is expressed relative to eNOS total content. **B:** Time course of eNOS dimer/monomer ratio during

IR (baseline = stabilization; I-30 = after 30 min of ischemia; R-10 = after 10 min of reperfusion) analyzed by the detection of SDS-resistant eNOS dimers on low temperature SDS-PAGE performed on sedentary and exercised rat hearts. Values are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. sedentary group; £ $p < 0.05$ Stab vs. Isch; & $p < 0.05$ Isch vs. Reperf.

Fig.4 Alterations of NOS dependent NO and ROS productions, associated with improved total antioxidant heart capacity, reduced nitro-oxidative stress during early reperfusion in exercised rat hearts. **A:** NO synthesis ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, Griess method) measured in coronary effluents collected during 10 early minutes of reperfusion from sedentary (Sed) and exercised (Ex) hearts perfused or not with L-NAME. NO production is expressed in $\mu\text{mol}/\text{ml}$. **B:** NOS-dependent reactive oxygen species (ROS), assayed by EPR spin trapping with CMH (1:1 v/v) in homogenates of sedentary and exercised heart freeze-clamped at 10 min of reperfusion. Values represented correspond to the difference between ROS measurements obtained in presence or not of L-NAME. ROS production is expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein content. **C:** Malondialdehyde (MDA) content, used as an index of lipid peroxidation, measured by dot blot after 10 min of reperfusion in sedentary and exercised rat hearts. **D:** Heart total antioxidant power (TAP) measured in homogenates of sedentary and exercised rat hearts. TAP is expressed in mM of Trolox equivalent antioxidant capacity. **E:** Protein nitrotyrosination measured at 10 min of reperfusion from sedentary and exercised rat hearts. Western blot analysis of nitrotyrosine content was performed on polyacrylamide-SDS gel allowing protein detection from 60 to 200 kDa. **F:** Illustration of immunoblotting detection of protein nitrotyrosination from 60 to 200 kDa in sedentary and exercised rat hearts at 10 min of reperfusion. Values are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. sedentary group; # $p < 0.05$ vs. homolog group treated with L-NAME.

Fig.5 Exercise training-induced cardioprotection requires eNOS uncoupling at early reperfusion. **A:** Effect of BH_4 on eNOS dimer/monomer ratio in exercised rat hearts, measured at the end of the ischemic period. The perfusion of BH_4 was performed during the 5 last minutes of stabilization. **B:** Effects of BH_4 on eNOS dimer/monomer ratio in exercised rat hearts, measured after 10 min of post-ischemic reperfusion. The perfusion of BH_4 was performed during 5 last minutes of stabilization and 5 early minutes of reperfusion. **C:** Left

ventricular developed pressure (LVDP) obtained on isolated Langendorff hearts of sedentary and exercise groups, perfused or not with BH₄ during 5 last minutes of stabilization and 5 early minutes of reperfusion, submitted to the IR procedure. LVDP is expressed in percentage of baseline. **D**: Infarct size of hearts from each experimental group, expressed in percentage of left ventricular area. Values are presented as mean ± SEM. * p<0.05 vs. sedentary group; § p<0.05 vs. homolog group treated with BH₄.

Fig.6 Exercise-induced cardioprotection: role of eNOS uncoupling. **1**: exercise training increases phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷ and improves myocardial antioxidant status. Increased eNOS-P^{Ser1177} is responsible for cellular nitric oxide (NO) metabolites storage (nitrites and S-nitrosothiols) [5]. **2**: Ischemia and early reperfusion decrease eNOS-P^{Ser1177} and importantly uncouple eNOS in exercised hearts. **3**: Uncoupled eNOS is responsible for an increase of superoxide anion (O₂⁻) synthesis and a decrease of NO production. **4**: Improved antioxidant status of the myocardium in exercised rats improves hearts capacity to buffer ROS. **5**: Such decrease of NOS-dependent NO synthesis associated with the improved capacity to buffer ROS might limit the reaction between NO and O₂⁻ and therefore reduced peroxynitrite (ONOO⁻) formation. **6**: Decreased ONOO⁻ formation and improved ROS buffering capacity are responsible for a reduced nitro-oxidative stress at early reperfusion in exercised hearts. In addition, we can also postulate that NO metabolites storage induced by exercise training contribute to maintain a functional requisite NO bioavailability during post-ischemic reperfusion despite eNOS uncoupling. **7**: Altogether, increased eNOS-P^{Ser1177} with exercise, eNOS uncoupling at early reperfusion and improved myocardial antioxidant status are key elements of exercise-induced cardioprotection.

Figure 2

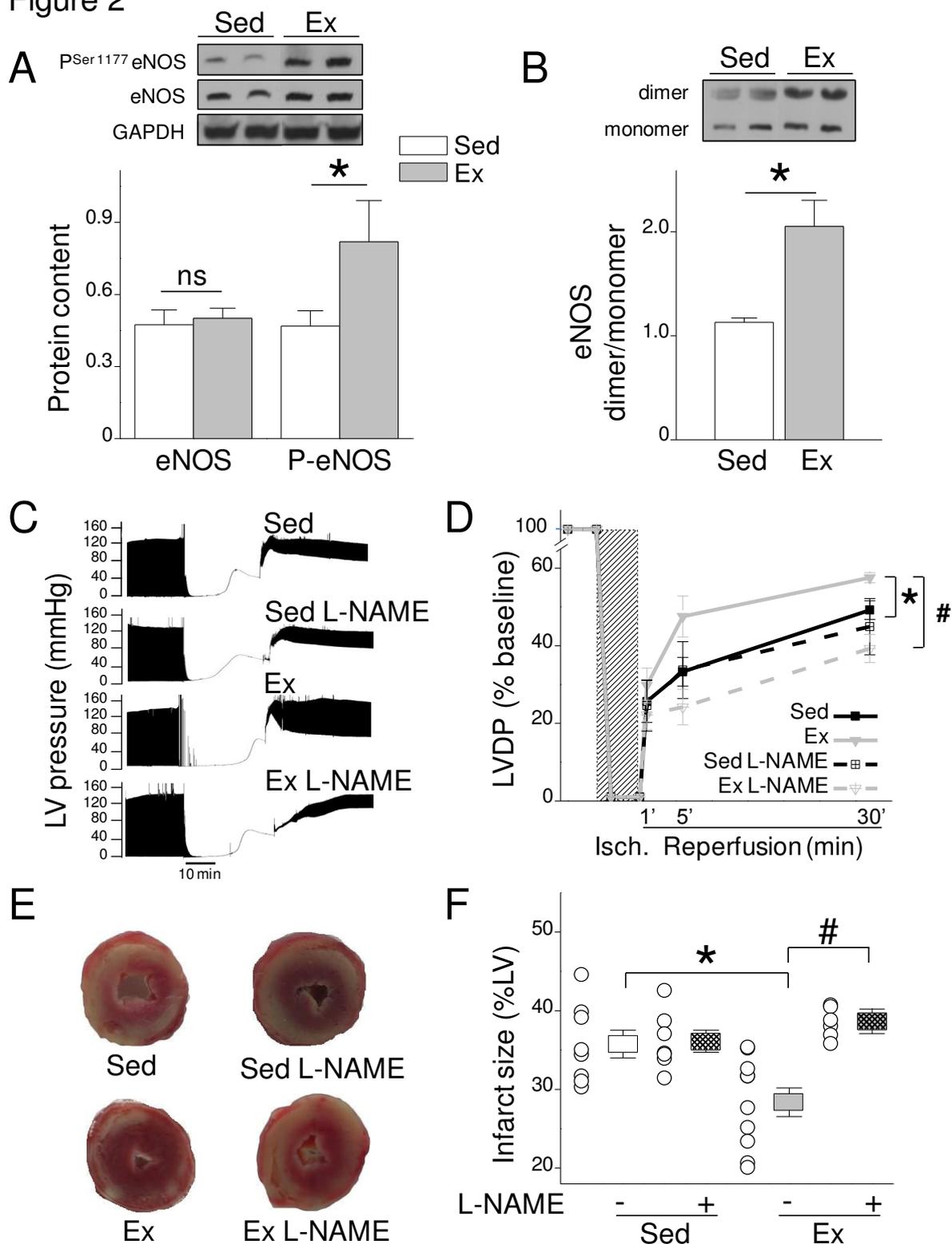


Figure 3

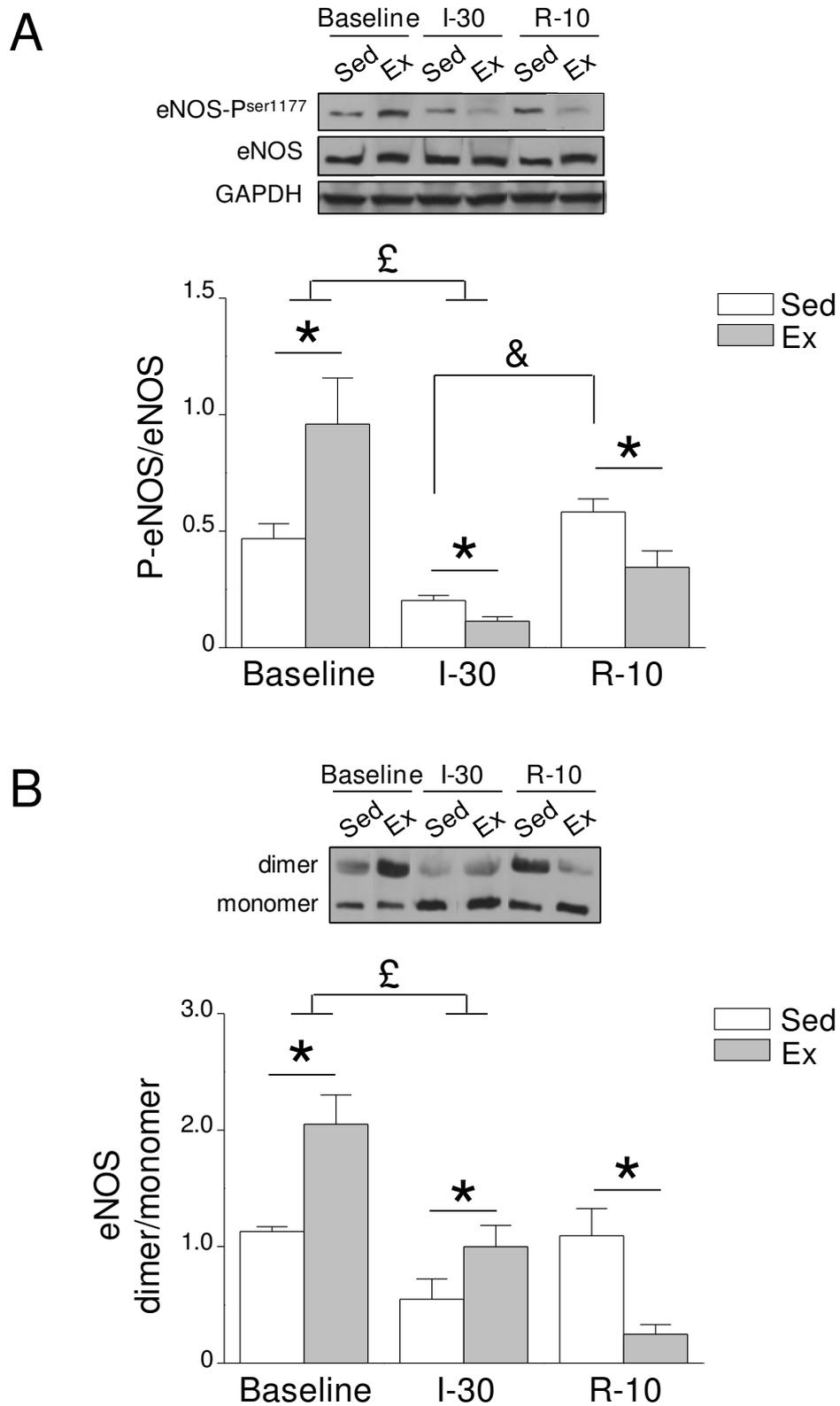


Figure 4

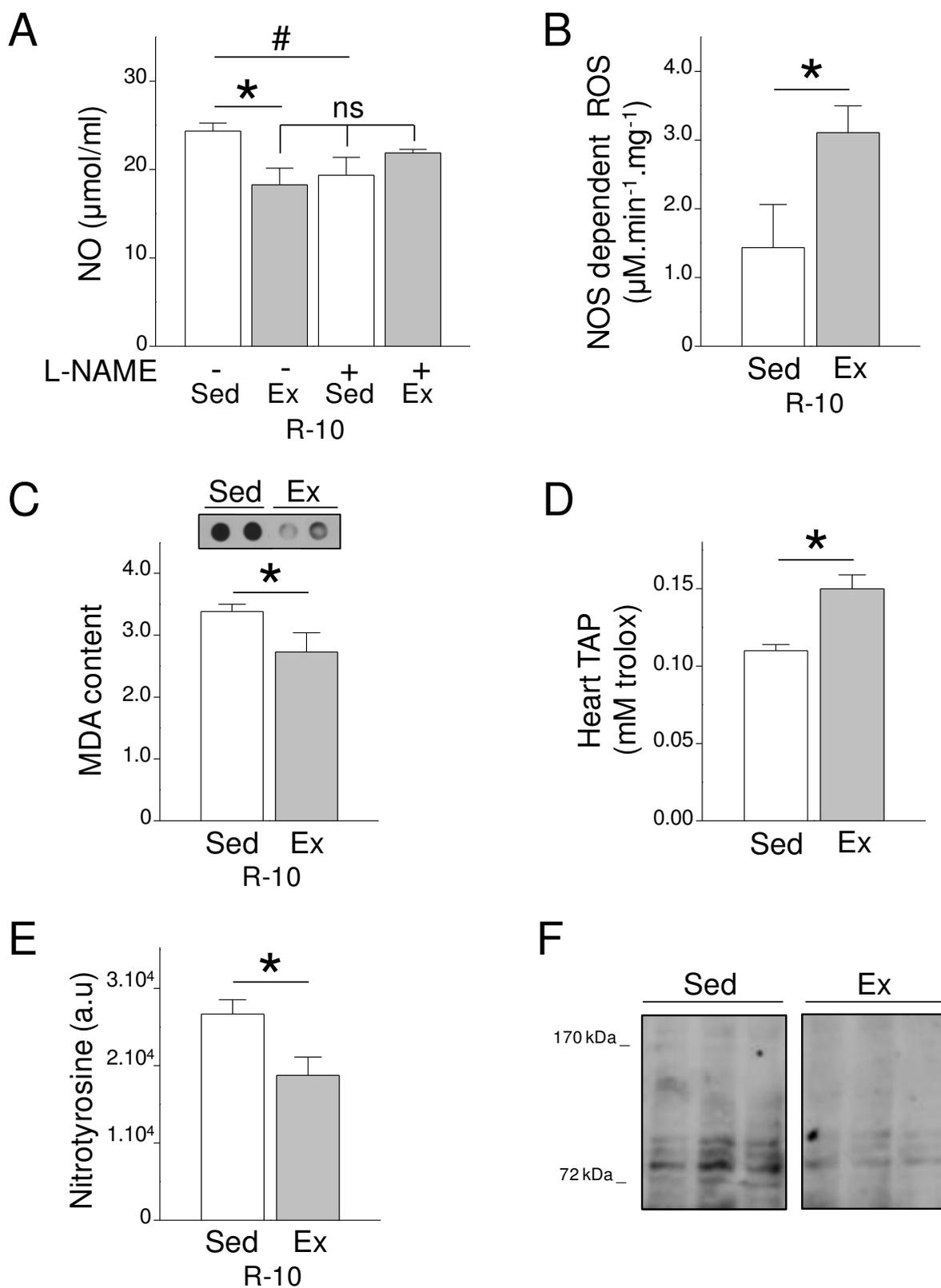


Figure 5

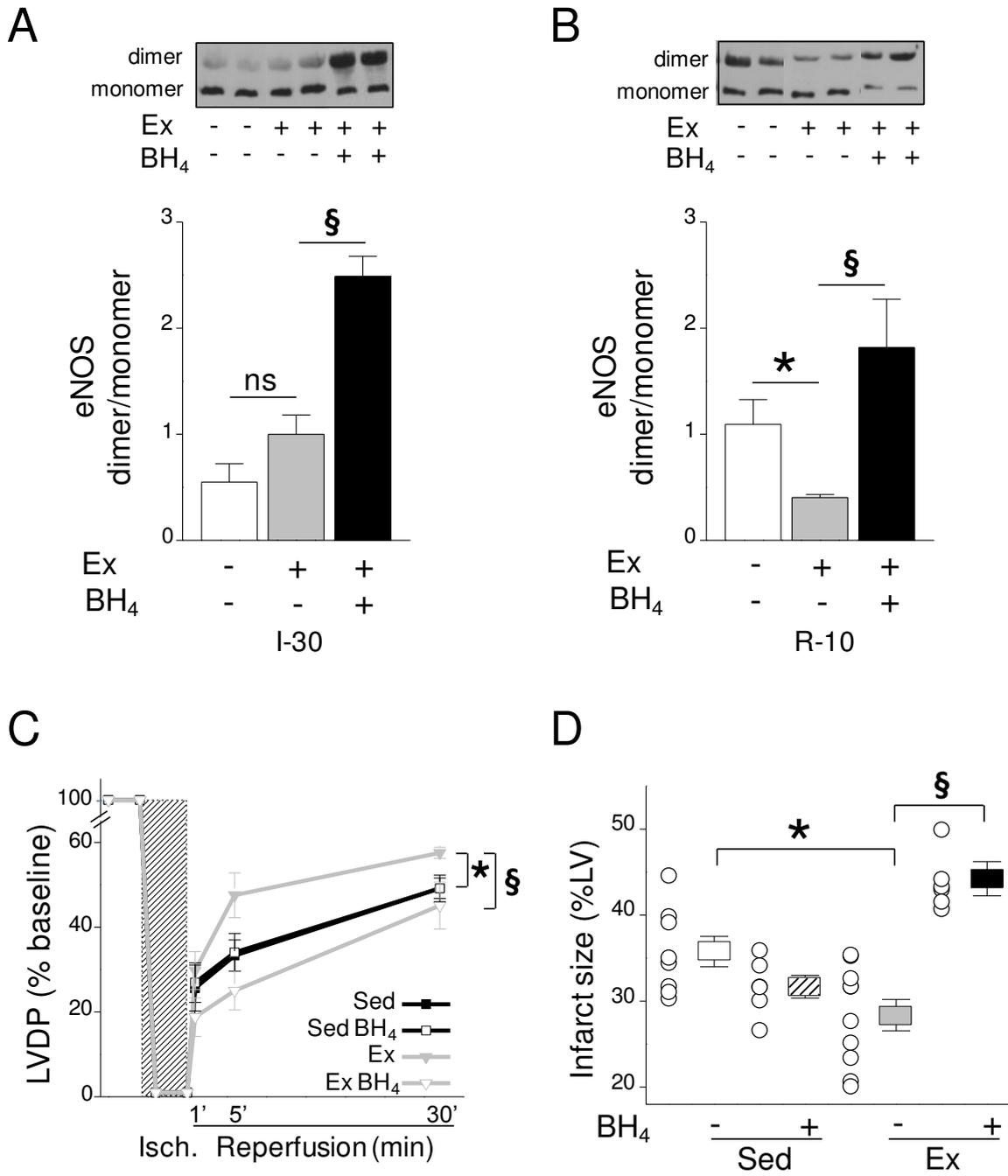
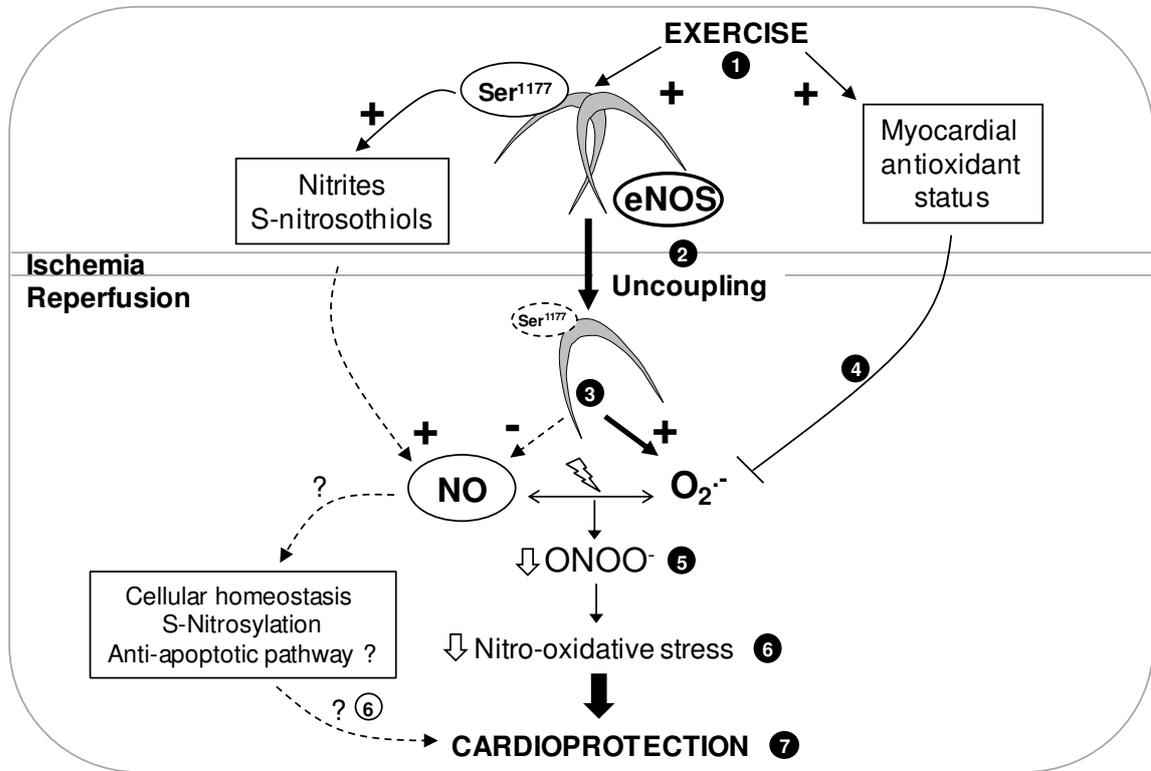


Figure 6



SUPPLEMENTAL DATA**Exercise-induced cardioprotection requires eNOS uncoupling.**

C. Farah¹, G. Meyer^{1,4,5}, G. Boleat¹, S. Gayraud¹, B. Geny⁴, P. Obert¹, O. Cazorla², S. Tanguy³, C. Reboul^{1*}.

¹, EA 4278, Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Faculty of Sciences, Avignon University, F-84000 Avignon, France.

², INSERM U1046, Université MONTPELLIER1, Université MONTPELLIER2, F-34295 Montpellier, France

³, TIMC PRETA: CNRS UMR 5525, Laboratoire Coeur & Nutrition, Grenoble University Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France.

⁴, EA 3072, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, F-67091 Strasbourg, France

⁵, UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie, Faculty of Pharmacy, Strasbourg University, F-67400 Illkirch, France.

***Corresponding Author:**

Cyril Reboul, PhD

Laboratory of Cardiovascular Pharm-Ecology

University of Avignon

Faculty of Sciences

33 rue Louis Pasteur

84000 Avignon, France

Ph: +334 90 16 29 33

Fax: +334 90 16 29 01

Email: Cyril.reboul@univ-avignon.fr

Detailed methods

All investigations complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, revised 1996) and with the approval of the French Ministry of Agriculture. All experiments have been approved by the local research ethics committee (Comité Régional d'Ethique, n°: 84.004).

Animals. Experiments were performed on Wistar male rats (Charles River Laboratories, France) aged of 12 weeks (382 ± 38 g). Rats were randomly assigned to sedentary group (Sed) or exercised group (Ex). All animals were maintained in standard animal house conditions, exposed to a 12:12 hour light-dark cycle and had free access to water and standard laboratory diet.

Exercise protocol. Ex rats were submitted to an exercise-training protocol for 5 weeks, performed on a motor driven treadmill, 5 days/week, 45 min/day at 70 % of maximal aerobic velocity (25 m/min). During the first week of the training period, rats were familiarized to the motor driven treadmill with daily increases of duration and intensity to achieve those described above.

Myocardial ischemia-reperfusion on isolated perfused rat hearts. After anesthesia (sodium pentobarbital, 100 mg/kg, *i.p.*) we were waiting until the total loss of consciousness was established and rats were heparinized (1000 UI/kg, *i.v.*). Then, a thoracotomy was performed and the heart was rapidly removed, by cutting the great vessels, and immersed in ice-cold Krebs solution. The heart was transferred to the perfusion apparatus and the aorta was cannulated for perfusion with oxygenated (95% O₂ / 5% CO₂) Krebs solution (37°C) composed of (in mM) : NaCl 118.3, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glucose 11.1, CaCl₂ 1.25 (pH= 7.4). The atrioventricular node was crushed using fine forceps, the right atrium was excised and the heart was paced at a rate of 300 beats /min with an electrical stimulator (Low voltage stimulator, BSL MP35 SS58L, 3V). A non-compliant balloon was inserted into the left ventricle (LV) *via* the mitral valve and the balloon volume was adjusted to achieve a left ventricular end diastolic pressure of 5 mmHg. The heart was perfused at a constant pressure (80 mmHg) and was allowed to stabilize for 30 minutes. A

global no flow ischemia was then performed during 30 minutes. Subsequently the heart was allowed to reperfuse for 120 minutes. All along the ischemia-reperfusion (IR) procedure cardiac functional parameters, such as LV developed pressure (LVDP) were recorded (MP35, BioPac System Inc) and coronary effluents were collected to evaluate coronary blood flow. At the end of the protocol, hearts were frozen to assess infarct size.

Assessment of myocardial infarct size. Hearts were cut in five 1-2 mm thin slices perpendicularly to the apex-base axis. Slides were then incubated for 25 minutes in a 2-3-5-triphenyltetrazolium-chloride (TTC, 0.5 mg/ml; Sigma) solution at 37°C. TTC staining allowed to distinguish healthy LV area (not stained) from infarct size (red staining). Each slices were photographed, monitored and a computerized planimetry was performed (ImageJ software) to determine infarct size. Infarct size was expressed in percentage of LV area.

Experimental protocol. The effects of exercise on eNOS were tested in a first set of hearts collected 24 hours after the end of exercise-training period. Hearts were frozen in liquid nitrogen for biochemical measurements. To assess the involvement of eNOS in exercise-induced cardioprotection, some hearts were perfused 5 minutes before and after ischemia with either a NOS inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 μ M) (Sed+L-NAME; Ex+L-NAME) or an eNOS coupling agent, BH₄ (50 μ M at tissue level) (Sed+BH₄; Ex+BH₄). In some hearts, BH₄ was perfused only during the 5 first minutes of reperfusion. At the end of the ischemic period or at 10 minutes of reperfusion (R-10), for each experimental group except those perfused with L-NAME, hearts were quickly removed, the right ventricle was cleaned up, and LV tissues were frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis. Finally, to evaluate the role of catecholamine-dependent phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷ in the exercise-induced cardioprotection, a set of sedentary rats received a single injection of epinephrine (Epi, 10 μ g/kg, *i.v.*) or of NaCl (0.9%) [5]. A tracheotomy was performed, rats were ventilated (SAR-830/P Ventilator, Bioseb), and maintained anesthetized at a constant temperature of 37°C with a heating pad warmed for 30 minutes. Heart viability was monitored with an ECG all along the procedure. Then a first set of hearts was frozen in liquid nitrogen to evaluate efficiency of Epi injection on eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷. Other set of hearts were perfused on a Langendorff apparatus and submitted to the IR procedure and frozen for biochemical measurements and infarct size assessment as described above (Fig. 1).

Protein extraction. Freeze-clamped LV tissues were homogenized in Tris-HCl buffer (50 mM, pH = 7.4; 1% SDS; 10% glycerol; protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich); phosphatase inhibitor (Na_3VO_4 ; Fischer Scientific)), at 4°C. Homogenates were then centrifuged at 17.000 g for 12 minutes at 4°C. The supernatant was used for biochemical analysis. Protein concentration was quantified with a BCA assay kit (Pierce® BCA protein assay kit ; Thermo Scientific).

Western blot analysis. Equal amounts of protein (50-100 µg) were separated by electrophoresis on a polyacrylamide-SDS gel and transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked for 1 or 2 hours with 10 % milk or 3 % bovine serum albumin in Tris-buffered saline containing 0.05 % Tween 20 (TBST), and probed with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies used in this study are the following: anti-mouse eNOS (1:1000; BD Transduction Laboratory), anti-mouse eNOS-P^{Ser1177} (1:1000; BD Transduction Laboratory), anti-mouse nNOS (1:500; BD Transduction Laboratory), anti-mouse iNOS (1:1000; BD Transduction Laboratory), anti-rabbit GAPDH (1:3000; Santa Cruz), anti-mouse GCH1 (1:500; Abnova), anti-rabbit nitrotyrosine (1:20000; Millipore Corporation). Immunodetection was revealed using ECL or ECL Plus system (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrat; Thermo Scientific; Luminata™ Forte Western HRP substrate; Millipore Corporation, respectively). The signal intensity of blotting on X-ray film was digitalized and quantified with ImageJ software (ImageJ, NIH, USA). Protein content was expressed relative to GAPDH content on the same membrane. eNOS-P^{Ser1177} was expressed relative to eNOS total content evaluated on the same membrane after stripping. To evaluate the eNOS dimer/monomer ratio heart homogenates for eNOS dimers detection were prepared in no-denaturing conditions (without β-mercaptoethanol; at 4°C) and all the procedure from PAGE-electrophoresis to the transfer onto a PVDF membrane was performed at 4°C.

Measurement of lipid peroxydation. To evaluate oxidative stress-dependent cellular damages, we measured the content of malondialdehyde (MDA), an end-product of lipid peroxidation by dot blot analysis as previously described [1]. Equal amounts of proteins (7 µg) from homogenized tissue were dotted onto a nitrocellulose membrane. Membrane was dried for 2 hours at room temperature, blocked for 2 hours with 5 % milk in TBST, and then incubated with primary antibody anti-rabbit MDA (1:500; Millipore Corporation) overnight at

4°C. Signal was revealed as described above. MDA content was expressed relative to Ponceau S staining.

Quantification of anion superoxide by EPR. ROS production was measured by electron paramagnetic resonance (EPR) in LV homogenates obtained as previously described for Western blot analysis and centrifuged at 600 g for 10 minutes at 4°C. A 1 mM 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine (CMH) solution was prepared in buffer (Krebs-Hepes buffer containing 25 µM deferoxamine methane-sulfonate salt (DF) chelating agent and 5 µM sodium diethyldithio-carbamate trihydrate (DETC)) at pH 7.4. Homogenates were treated with CMH solution (1:1 v/v), put in the EPR glass capillary tube (Noxygen Science Transfer & Diagnostics, Germany), and were placed inside the e-scan spectrometer (Bruker, Germany) for data acquisition. The procedure was then repeated on the same samples but in presence of L-NAME ($3 \cdot 10^{-4}$ M). The difference between the two conditions gave the NOS-dependent ROS production. The actual amount of solution analyzed (50 µL) was chosen to fill the entire sensitive area of the resonator cavity. The acquisition EPR parameters were: microwave frequency = 9.652 GHz; modulation frequency= 86 kHz; modulation amplitude= 0,01 G; center field= 3494.9 G, sweep width: 300 G, microwave power: 1.0 mW, number of scans: 10; receiver gain: $2 \cdot 10^{-1}$. Sample temperature was kept at 37°C by the Temperature & Gas Controller “Bio III” unit, interfaced to the spectrometer. The radicals generated by the reaction of the probe with the tissue radicals were acquired and the spectra sequentially recorded for about 5 minutes in order to calculate the ROS production rate. The EPR signal is proportional to the unpaired electron numbers and could, in turn, be transformed in absolute produced micromoles ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$). ROS production was then normalized to the protein content of each sample [3].

Statistical analysis. Data are expressed as mean \pm SEM. For multiple experimental conditions comparison, ANOVA or repeated ANOVA were used, followed by PLSD Fischer post-hoc test. For two mean values difference analysis, Student *t*-test was used. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

References

1. Andre L, Gouzi F, Thireau J, Meyer G, Boissiere J, Delage M, Abdellaoui A, Feillet-Coudray C, Fouret G, Cristol JP, Lacampagne A, Obert P, Reboul C, Fauconnier J, Hayot M, Richard S, Cazorla O (2011) Carbon monoxide exposure enhances arrhythmia after cardiac stress: involvement of oxidative stress. *Basic Res Cardiol* 106:1235-1246
2. Bouitbir J, Charles AL, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B, Zoll J (2012) Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J* 33:1397-1407
3. Calvert JW, Condit ME, Aragon JP, Nicholson CK, Moody BF, Hood RL, Sindler AL, Gundewar S, Seals DR, Barouch LA, Lefer DJ (2011) Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res* 108:1448-1458

Supplemental figures

Online Fig. 1

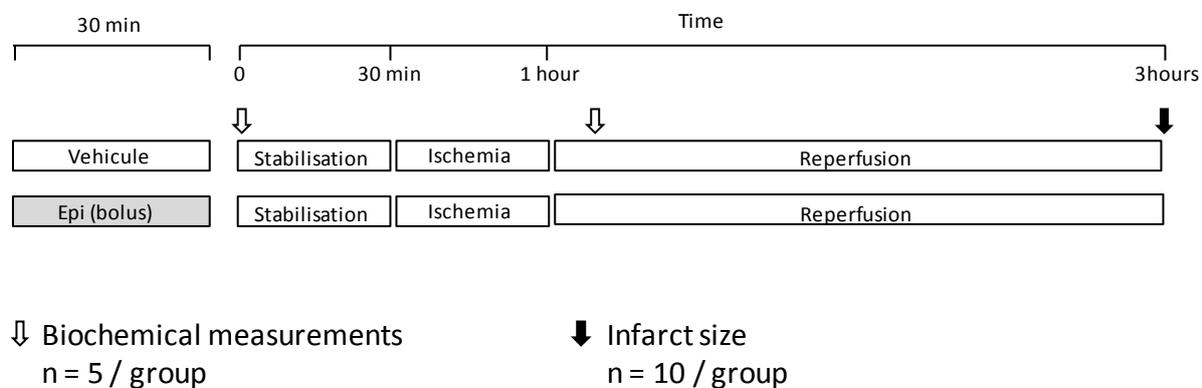


Fig.1 Schematic illustration of the experimental designs used for the epinephrine protocole. A single injection of Epinephrine (Epi, 10 μ g/kg, i.v.; Epi group) or NaCl (0.9 %; vehicule group) were performed. Hearts were then taken 30 minutes following the single injection and next submitted to the Langendorff heart IR protocol.

Online Fig. 2

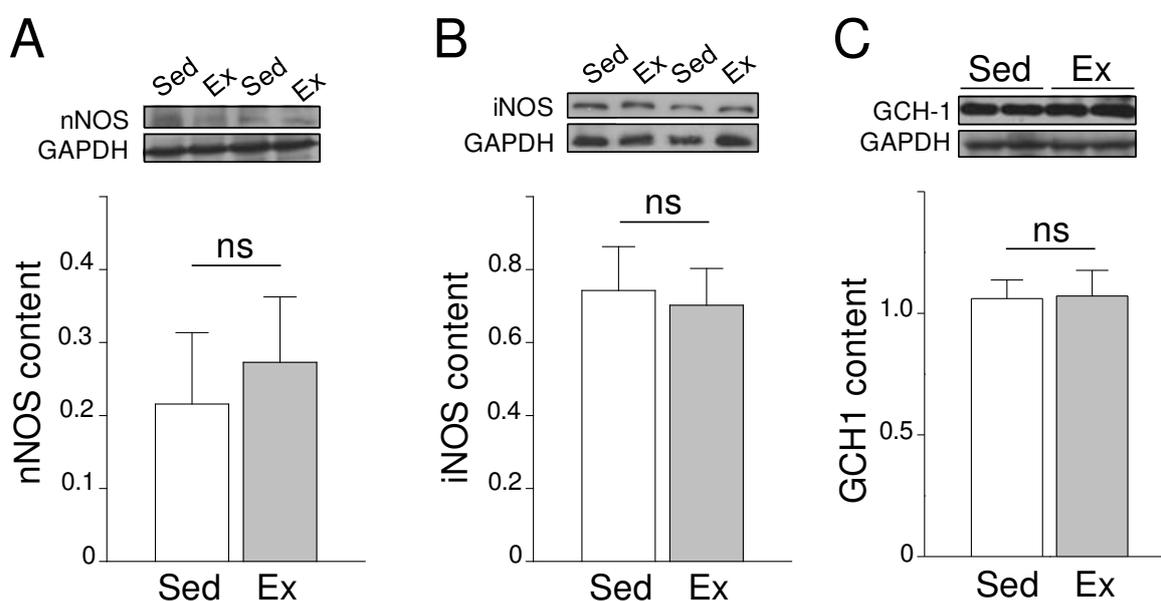


Fig.2 Effects of exercise on nNOS, iNOS and GCH-1 expressions. **A:** Effect of exercise on nNOS expression analyzed by western blot performed on sedentary (Sed) and exercised (Ex) rat hearts. **B:** Effect of exercise on iNOS expression analyzed by western blot performed on sedentary and exercised rat hearts. **C:** Effect of exercise on GCH-1 expression analyzed by western blot performed on sedentary and exercised rat hearts. Protein contents are expressed relative to GAPDH contents. Values are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. sedentary group.

Online Fig. 3

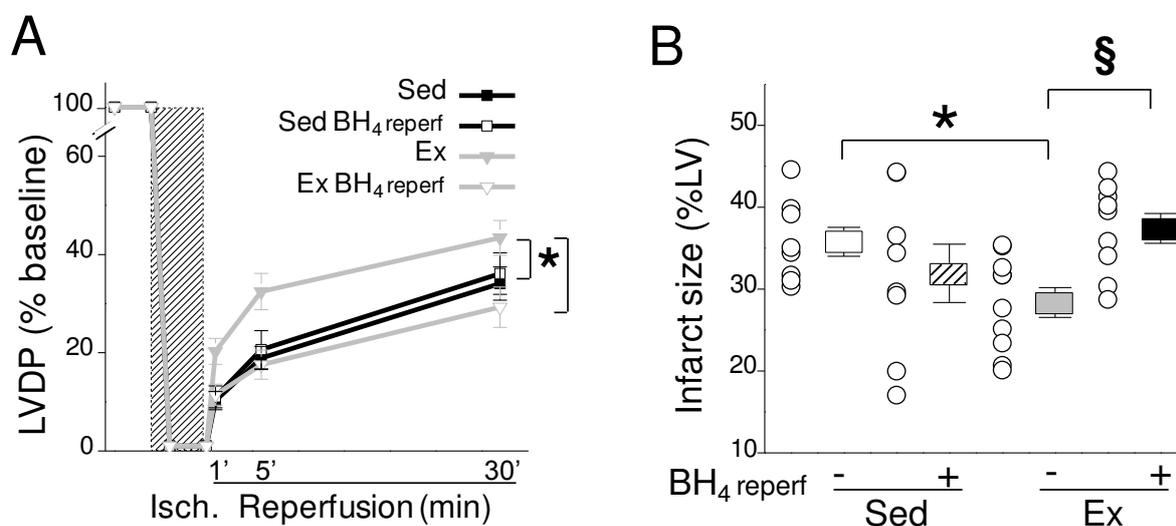


Fig.3 Exercise training-induced cardioprotection requires eNOS uncoupling at early reperfusion: effect of BH₄ perfusion during 5 first minutes of reperfusion. **A:** Left ventricular developed pressure (LVDP) on isolated Langendorff hearts of sedentary and exercised groups, perfused with BH₄ during 5 first minutes of reperfusion, submitted to the IR procedure. LVDP is expressed in percentage of baseline. **B:** Infarct size of hearts from each experimental group, expressed in percentage of left ventricular area. Values are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. sedentary group; § $p < 0.05$ vs. homolog group treated with BH₄ reperfusion.

Online Fig. 4

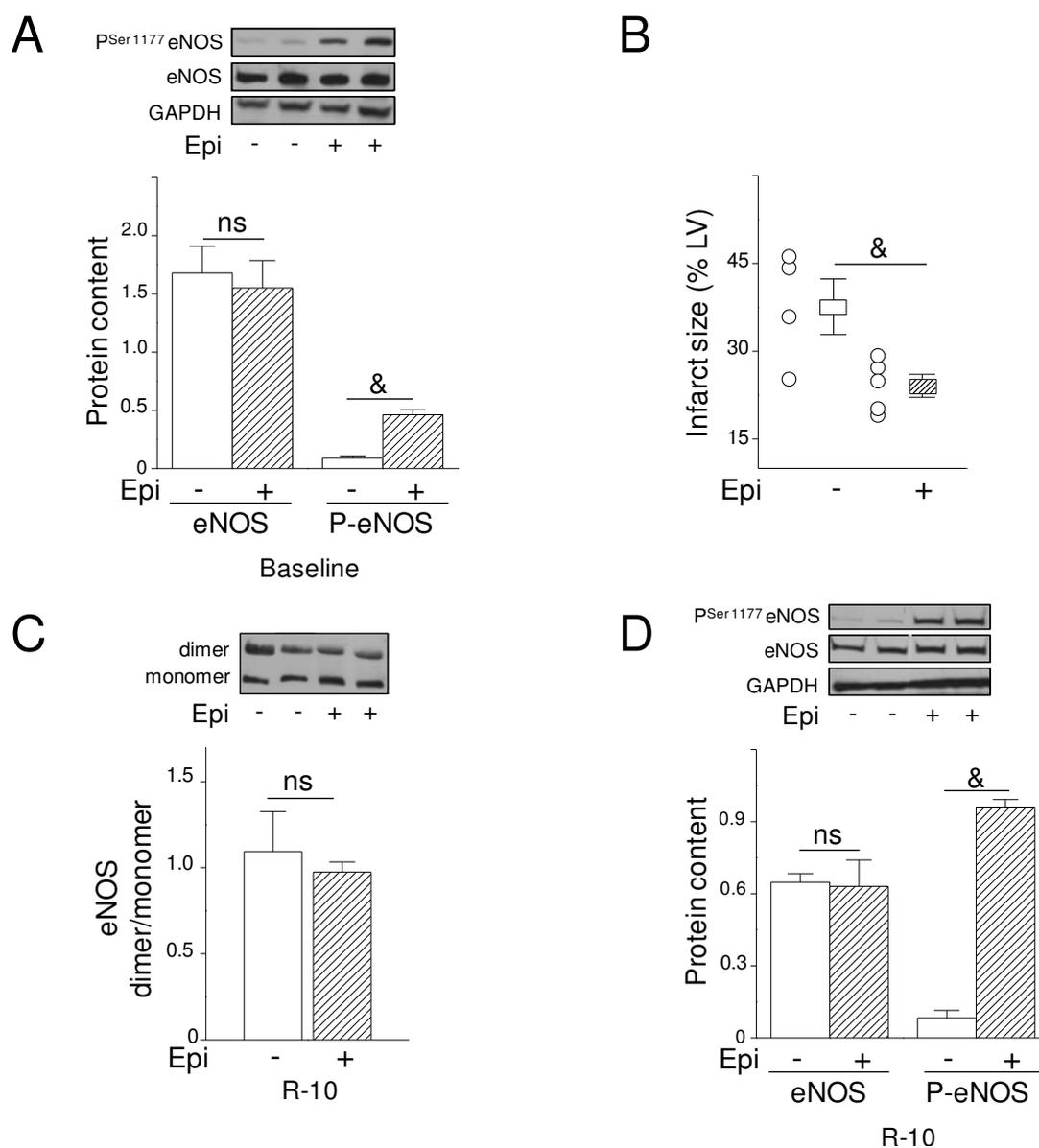


Fig.4 Catecholamine dependent-phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷ with epinephrine reduces heart sensitivity to IR, but differs from exercise-dependent cardioprotection.

A: eNOS expression and eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ from hearts treated or not with a single injection of epinephrine (Epi). eNOS is expressed relative to GAPDH content, and eNOS-P^{Ser1177} is expressed relative to eNOS total content. **B:** Infarct size expressed in percentage of left ventricular area. **C:** Effects of IR on eNOS dimer/monomer ratio from hearts treated or not with a single injection of Epi, measured at 10 minutes of reperfusion. **D:** Effects of IR on eNOS expression and eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ from hearts treated

or not with a single injection of Epi, measured at 10 minutes of reperfusion. Values are presented as mean \pm S.E.M. & $p < 0.05$ vs. group treated with Epi.

Sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion et stratégie de cardioprotection par l'exercice : rôle spécifique de la eNOS myocardique.

RÉSUMÉ

L'infarctus du myocarde constitue la première cause de mortalité cardiovasculaire. Ainsi, toute stratégie permettant de moduler la vulnérabilité du cœur à l'ischémie-reperfusion (IR) peut représenter un intérêt majeur de santé publique. L'exercice en endurance est reconnu comme une stratégie de cardioprotection efficace dont les mécanismes cellulaires restent néanmoins peu connus. Les objectifs de ce travail de thèse sont donc i) d'évaluer le rôle préventif de l'exercice sur le développement d'un phénotype sensible à l'IR myocardique, et ii) de tenter de mieux comprendre le rôle de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice. Dans la première partie de ce travail, nous avons mis en évidence que l'exercice permet de prévenir le développement d'un phénotype pathologique cardiomyocytaire, par une amélioration du statut antioxydant et un maintien de l'homéostasie calcique cellulaire, et ainsi permet de normaliser la sensibilité du cœur à l'IR chez une population à risque. Dans un second temps, les travaux réalisés ont permis de mettre en avant le rôle majeur de la eNOS dans la cardioprotection par l'exercice. Cette cardioprotection est associée à une diminution du niveau de phosphorylation (Ser¹¹⁷⁷) et surtout de l'état de découplage de cette enzyme au cours des premières minutes de reperfusion. Ces modifications, associées à l'amélioration du statut antioxydant cardiaque par l'exercice, sont à l'origine d'une diminution du stress nitro-oxydant au cours de la reperfusion, expliquée par une moindre synthèse de NO et une meilleure capacité à éliminer l'O₂⁻, permettant ainsi de limiter la synthèse de ONOO⁻. L'ensemble de ce travail de thèse a ainsi permis de mettre en évidence la complexité de la cardioprotection par l'exercice, nécessitant l'interaction entre différents mécanismes cellulaires tels que l'amélioration du statut enzymatique antioxydant, le découplage de la eNOS au cours de la reperfusion précoce et la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Ce travail a d'autre part permis de mieux appréhender le rôle complexe de la voie de synthèse du NO par la eNOS dans la modulation de la vulnérabilité du cœur à un stress tel que l'IR.

Mots-clés : ischémie-reperfusion, exercice, stress nitro-oxydant, découplage de la eNOS.

Heart sensitivity to ischemia-reperfusion and exercise-induced cardioprotection: involvement of myocardial eNOS.

ABSTRACT

Exercise training is recognized as an efficient way to protect the myocardium against ischemia-reperfusion (IR). However, mechanisms responsible for such cardioprotection remain still unclear. The aims of this work were then i) to evaluate the preventive effect of exercise on a model highly sensitive to myocardial IR, and ii) to investigate the role of eNOS in exercise-induced cardioprotection. In a first part we showed that regular bouts of exercise, by its beneficial effects on calcium handling and enzymatic antioxidant status, prevents the highly sensitive phenotypical remodeling of the heart and then normalized heart vulnerability to IR. Then, in a second part of this work, we showed that exercise-induced cardioprotection was associated with a decrease of eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ and especially its uncoupling during early reperfusion. Such phenomenon, associated with increased heart antioxidant capacity was responsible for reduced nitro-oxidative stress. Indeed, reduced NOS-dependent NO synthesis associated with the improved capacity to scavenge O₂⁻ contribute to prevent the formation of ONOO⁻. Altogether, these results showed that exercise-induced cardioprotection is a complex mechanism requiring interactions between antioxidant capacity improvement, eNOS uncoupling during reperfusion and intracellular calcium homeostasis. Finally, this work opens new perspectives regarding the role of NO synthesis modulation to impact heart sensitivity to IR.

Keys words: ischemia-reperfusion, exercise, nitro-oxidative stress, eNOS uncoupling.