



**HAL**  
open science

# Développement de stratégies naturelles de cardioprotection : Quel rôle pour la mitochondries ?

Doria Boulghobra

► **To cite this version:**

Doria Boulghobra. Développement de stratégies naturelles de cardioprotection : Quel rôle pour la mitochondries ?. Autre. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0718 . tel-03212319

**HAL Id: tel-03212319**

**<https://theses.hal.science/tel-03212319v1>**

Submitted on 29 Apr 2021

**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.

## THESE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITE

En vue de l'obtention du grade de

Docteur d'Avignon Université

Présentée par : **Doria BOULGHOBRA**

Spécialité : **Physiologie**

---

# Développement de stratégies naturelles de cardioprotection :

## Quel rôle pour la mitochondrie ?

---

Ecole Doctorale Agrosciences et sciences, ED 536

Soutenue publiquement le **3 février 2021** devant le jury composé de :

Mme <b>MORIO Béatrice</b>	<i>DR INRAE, CaRMen, Lyon</i>	<b>Rapportrice</b>
M. <b>LACAMPAGNE Alain</b>	<i>DR CNRS, PHYMEDEXP, Montpellier</i>	<b>Rapporteur</b>
Mme <b>VERGELY Catherine</b>	<i>PU, PEC2, Université de Dijon</i>	<b>Examinatrice</b>
M. <b>DANGLES Olivier</b>	<i>PU, SQPOV, Avignon Université</i>	<b>Examineur</b>
M. <b>REBOUL Cyril</b>	<i>MCU-HDR, Avignon Université</i>	<b>Directeur de thèse</b>



## **VALORISATIONS SCIENTIFIQUES**

Les travaux exposés dans le présent manuscrit ont fait l'objet de plusieurs études publiées ou soumises à publication. Les résultats ont également été présentés sous forme de communications orales ou de posters lors de congrès nationaux ou de journées scientifiques.

Un projet collaboratif avec le laboratoire de Physiologie et de Médecine Expérimentale (U1046) ainsi que la société Naturex a été réalisé au cours de ces trois années de thèse (**ÉTUDE 1**) grâce à l'obtention d'une bourse de mobilité par le Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC). Ceci a donné lieu à un article scientifique publié en tant que premier auteur dans la revue Redox Biology (**IF : 9.98**) ainsi qu'au dépôt d'un brevet.

## LISTE DES PUBLICATIONS

### Publications acceptées

---

- ✚ **Boulghobra, D.**, Coste, F., Geny, B., and Reboul, C. (2020a). Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* 152, 395–410 (IF : 6.17).
- ✚ **Boulghobra, D.**, Grillet, P.-E., Laguerre, M., Tenon, M., Fauconnier, J., Fañça-Berthon, P., Reboul, C., and Cazorla, O. (2020b). Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes. *Redox Biol.* 34, 101554 (IF: 9.98).
- ✚ Fourny, N., Lan, C., Kober, F., **Boulghobra, D.**, Bresciani, J., Reboul, C., Bernard, M., and Desrois, M. (2019). Cardiac remodeling and higher sensitivity to ischemia-reperfusion injury in female rats submitted to high-fat high-sucrose diet: An in vivo/ex vivo longitudinal follow-up. *J. Nutr. Biochem.* 69, 139–150 (IF : 4.5).
- ✚ Meziat, C., **Boulghobra, D.**, Strock, E., Battault, S., Bornard, I., Walther, G., and Reboul, C. (2019). Exercise training restores eNOS activation in the perivascular adipose tissue of obese rats: Impact on vascular function. *Nitric Oxide* 86, 63–67 (IF : 4.36).
- ✚ Kleindienst, A., Battault, S., Belaidi, E., Tanguy, S., Rosselin, M., **Boulghobra, D.**, Meyer, G., Gayrard, S., Walther, G., Geny, B., et al. (2016). Exercise does not activate the  $\beta$ 3-adrenergic receptor–eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res. Cardiol.* 111, 40 (IF: 11.9).

### Publications en cours

---

- ✚ **Boulghobra, D.**, Dubois M., Coste F., Bornard I., Alpha-Bazin B., Gaillard C., Armengaud J., Farah C., Reboul C., Increased protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria : key mechanism of exercise-induced cardioprotection. *Manuscript under preparation.*

# LISTE DES COMMUNICATIONS

## Communications orales

---

- ✚ **Octobre 2020 - Présentation orale : Printemps de la Cardiologie, e-congrés**  
Session internationale: "Sinapine a natural antioxidant targeting cardiac mitochondria"  
D. Boulghobra, P.E. Grillet, M. Laguerre, M. Tenon, J. Fauconnier, P. Fanca-Berthon, C. Reboul, O. Cazorla.
- ✚ **Juin 2019 - Présentation orale : Congrès de Physiologie et de biologie intégrative, Montpellier.**  
"eNOS targeting mitochondria with exercise: key role in cardioprotection ? "  
D. Boulghobra, E. Frileux, F. Coste, S. Gayrard, C. Reboul.
- ✚ **Mai 2019 - Présentation orale : MidiSciences, Avignon Université**  
«The mitochondria a key trigger of myocardial infarction"; D. Boulghobra.

## Posters commentés

---

- ✚ **Octobre 2020 - Poster : Printemps de la Cardiologie, e-congrés**  
"Translocation of eNOS to mitochondria with exercise training: a key trigger of cardioprotection"  
D. Boulghobra, M. Olmos, E. Frileux, F. Coste, S. Gayrard, C. Reboul.
- ✚ **Avril 2019 - Poster : Printemps de la Cardiologie, Lille**  
" eNOS targeting mitochondria with exercise: key role in cardioprotection ? "  
D. Boulghobra, E. Frileux, S. Gayrard, C. Reboul.
- ✚ **Avril 2018 - Poster : Printemps de la Cardiologie, Montpellier**  
"eNOS targeting mitochondria with exercise: key role in cardioprotection ? "  
D. Boulghobra, E. Frileux, S. Gayrard, C. Reboul.
- ✚ **Avril 2017 - Poster : Printemps de la Cardiologie, Nantes**  
" Effect of exercise on eNOS translocation to sub-sarcolemmal mitochondria "  
D. Boulghobra, E. Frileux, S. Gayrard, Guillaume Walther, Olivier Cazorla, Cyril Reboul.
- ✚ **Avril 2016 - Poster : Printemps de la Cardiologie, Dijon**  
" Phenotypic remodeling of perivascular adipose tissue in a rat model of metabolic syndrome: vascular consequences and beneficial impact of exercise training "  
C. Meziat, D. Boulghobra, A. Do Nascimento, E. Strock, S. Battault, S. Gayrard, N. Gayrard, B. Jover, G. Walter, C. Reboul.

## Prix et Bourses

---

- ✚ **Octobre 2020 - Prix communication orale - Printemps de la Cardiologie 2020-Session internationale (e-Congrès).**
- ✚ **Juin 2019 - Prix communication orale – Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative, Montpellier.**
- ✚ **Octobre 2017 - Bourse de mobilité du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (PHYMEDEXP, Montpellier, 1 mois).**

## Brevet

---

- ✚ **2019- Mitochondria targeted mitochondria, PATENT APPLICATION NUMBER 1916219.7 Boulghobra, D., Laguerre M., Tenon M., Fauconnier, J. Faça-Berthon, P. Reboul, C., Cazorla O. NATCO/P69651GB [PC-ACTIVEUK.FID4079944].**

# **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE DE LITTERATURE .....</b>	<b>7</b>
<b>Chap 1 : Ischémie- Reperfusion : Place de la mitochondrie dans ce phénomène .....</b>	<b>8</b>
<b>I. Ischémie-reperfusion myocardique : Généralités.....</b>	<b>8</b>
1. Définition et généralités.....	8
2. Lésions d'ischémie.....	9
3. Lésions de reperfusion .....	11
3.1. La sidération myocardique .....	12
3.2. Le phénomène de no-reflow .....	13
3.3. Les troubles du rythme liés à la reperfusion .....	13
3.4. La mort cellulaire myocardique.....	14
3.5. Les médiateurs de la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique.....	19
<b>II. La mitochondrie dans l'Ischémie-Reperfusion.....</b>	<b>20</b>
1. Fonctionnement cardiaque et mitochondrie .....	20
1.1. Les mitochondries : Généralités.....	21
1.2. Mitochondrie et métabolisme énergétique cardiaque .....	23
1.3. La mitochondrie au centre de l'homéostasie cellulaire .....	26
2. Altérations mitochondriales liées à l'ischémie-reperfusion.....	27
2.1. Altération de l'homéostasie calcique au cours de l'IR .....	27
2.2. Modification d'EROs mitochondriales au cours de l'Ischémie-Reperfusion .....	33
2.3. Interaction ERO-Ca <sup>2+</sup> au cours de l'Ischémie-reperfusion : activation du mPTP .....	36
<b>Chap 2 : Stratégies de cardioprotection : la mitochondrie cible privilégiée des stratégies de cardioprotection</b>	<b>43</b>
<b>I. Généralités sur le conditionnement cardiaque.....</b>	<b>43</b>
<b>II. Le NO acteur clé de la cardioprotection .....</b>	<b>46</b>
1. Généralités sur le NO et sa place dans le système cardiovasculaire .....	46
1.1. Synthèse de NO par les NOS .....	47
1.2. Voies de signalisation et cibles cellulaires du NO .....	52
2. NO mitochondrial et cardioprotection.....	53
2.1. NOSmt .....	53
2.2. NO et mitochondrie : quel rôle dans la cardioprotection .....	55

<b>III. Stratégies antioxydantes ciblant la mitochondrie .....</b>	<b>58</b>
1. Traitements antioxydants non ciblés .....	58
1.1. Généralités sur les antioxydants .....	59
2. Antioxydants de synthèse ciblant la mitochondrie .....	60
2.1. Cations lipophiles .....	60
2.2. Ciblage basé sur les peptides .....	64
2.3. Découplage mitochondrial .....	66
<b>IV. La mitochondrie : cible de la cardioprotection induite par l'exercice .....</b>	<b>66</b>
1. Revue de littérature publiée .....	68
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....</b>	<b>85</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>88</b>
<b>I. Populations expérimentales.....</b>	<b>91</b>
1. <i>Etude 1</i> : La sinapine, un antioxydant naturel permettant de réduire le stress oxydant mitochondrial au cours d'une ischémie cardiaque.....	91
1.1. Groupes expérimentaux.....	91
1.2. Les composés utilisés .....	91
1.3. Design expérimental .....	92
2. <i>Etude 2</i> : Conditionnement des mitochondries cardiaques par l'exercice physique : rôle du NO ? .....	93
2.1. Groupes expérimentaux.....	93
<b>2.2. Organisation des expérimentations.....</b>	<b>93</b>
2.3. Protocole d'exercice physique .....	94
<b>II. Evaluation des paramètres biologiques et physiologiques .....</b>	<b>95</b>
1. Vitesse Maximale Aérobie (Etude 2) .....	95
2. Ischémie Reperfusion sur cœur isolé perfusé de Langendorff .....	96
2.1. Protocole d'ischémie reperfusion .....	96
2.2. Mesure des paramètres fonctionnels cardiaques .....	99
2.3. Evaluation de la production d'ERO tissulaire au cours de la reperfusion (ETUDES n°1 et n°2)..	100
3. Mesure sur cardiomyocytes isolés .....	101
3.1. Isolement des cardiomyocytes.....	101
3.2. Biodisponibilité de la sinapine à l'échelle cardiomyocytaire (ETUDE 1) .....	102
3.3. Evaluation de la production d'ERO.....	103
3.4. Mesure de la production de NO (ETUDE 2).....	105
4. Evaluation de la sensibilité des mitochondries à un stress calcique (Etude 2) .....	109
4.1. Préparation des extraits mitochondriaux.....	109

4.2.	Capacité de rétention calcique (CRC) (ETUDE 2).....	111
4.3.	Test de gonflement des mitochondries (ETUDE 2) .....	113
<b>III.</b>	<b>Analyses biochimiques .....</b>	<b>115</b>
1.	Extraction des protéines et dosage de la concentration protéique.....	115
1.1.	Sur homogénat de cœur total (VG).....	115
1.2.	Sur mitochondries isolées .....	115
2.	Western Blot .....	116
3.	Mesure du s-nitrosoproteome des mitochondries cardiaques .....	116
3.1.	Mesure de la s-nitrosylation par Western Blot .....	117
3.2.	Mesure du S-nitroproteome par LC-MS/MS .....	118
<b>IV.</b>	<b>Traitement statistique .....</b>	<b>120</b>
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>121</b>
<b>I.</b>	<b>Etude n°1 .....</b>	<b>123</b>
1.	Contexte scientifique .....	123
2.	Objectifs .....	123
3.	Résumé.....	124
3.1.	Méthodologie et résultats majeurs :.....	124
3.2.	Conclusion .....	124
4.	Article .....	126
5.	Données supplémentaires.....	137
<b>II.</b>	<b>Etude n°2 .....</b>	<b>142</b>
1.	Contexte scientifique .....	142
2.	Objectifs .....	142
3.	Résumé.....	142
3.1.	Méthodologie et résultats majes .....	142
3.2.	Conclusion .....	143
4.	Article .....	144
5.	Données supplémentaires.....	180
	<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>190</b>
<b>I.</b>	<b>Discussion Générale .....</b>	<b>191</b>
1.	Activation du mPTP : stress calcique ou espèces réactives de l'oxygène ? .....	191
2.	Le stress oxydant au centre des lésions d'IR ? .....	192

3. Le rôle des troubles de l'homéostasie calcique au centre des lésions d'IR ?.....	194
4. Le mPTP, une cible de l'exercice ?.....	196
<b>II. Conclusion .....</b>	<b>198</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>199</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>203</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>234</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADP</b> : adénosine diphosphate	<b>NHE</b> : échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$
<b>ATP</b> : Adenosine triphosphate	<b>nNOS</b> : monoxyde d'azote synthétase neuronal
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : calcium	<b>NO</b> : monoxyde d'azote
<b>CEC</b> : couplage excitation-contraction	<b>NOS</b> : monoxyde d'azote synthétase
<b>CTE</b> : chaîne de transfert des électrons	<b>O<sub>2</sub></b> : oxygène
<b>Cx43</b> : connexine 43	<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> : superoxyde
<b>Cyp D</b> : cyclophiline D	<b>RS</b> : réticulum sarcoplasmique
<b>cyt c</b> : cytochrome c	<b>RyR</b> : récepteur à la ryanodine
<b>eNOS</b> : nitrique oxyde synthétase endothéliale	<b>SERCA</b> : sarco/reticulum endoplasmique $\text{Ca}^{2+}$ ATPase
<b>ERO</b> : espèce réactive de l'oxygène	<b>SNO</b> : nitrosothiol
<b>EROMt</b> : espèce réactive de l'oxygène mitochondriale	<b>SNOp</b> : S-nitrosylation protéique
<b>GSNO</b> : S-nitrosoglutathion	<b>SSM</b> : mitochondrie sub-sarcolemmale
<b>IFM</b> : mitochondrie intermyofibrillaire	<b>SSM</b> : mitochondrie sub-sarcolemmales
<b>IMM</b> : membrane interne mitochondriale	<b>TPP<sup>+</sup></b> : triphénylphosphonium
<b>iNOS</b> : monoxyde d'azote synthétase inductible	<b>VDAC</b> : voltage dependant anion channel
<b>IR</b> : Ischémie-reperfusion	<b><math>\Delta\Psi_m</math></b> : potentiel de membrane mitochondrial
<b>MAM</b> : membrane associée à la mitochondrie	
<b>MCU</b> : uniporteur de calcium mitochondrial	
<b>MICU 1</b> : «mitochondria calcium uptake 1 »	
<b>MICU 2</b> : «mitochondria calcium uptake 2 »	
<b>mPTP</b> : mégapore de transition de perméabilité mitochondrial	
<b>NCX</b> : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	

## INDEX DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : La reperfusion post-ischémique, une épée à double tranchant dans la survie du tissu myocardique (Adaptée de Hausenloy et al., 2013).....	9
<b>Figure 2</b> : Schéma représentant les principales modifications au sein du cardiomyocyte au cours de l'ischémie (Adaptée de Hausenloy et al., 2013).....	11
<b>Figure 3</b> : Les différents types de mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion.....	16
<b>Figure 4</b> : Mécanismes d'induction de la nécroptose. ....	18
<b>Figure 5</b> : Schéma représentant les principales modifications cardiomyocytaires au cours de l'ischémie-reperfusion. ....	20
<b>Figure 6</b> : Principales caractéristiques des différents compartiments de la mitochondrie cardiaque...22	
<b>Figure 7</b> : Respiration mitochondriale. ....	25
<b>Figure 8</b> : La mitochondrie au centre de l'homéostasie cellulaire. ....	26
<b>Figure 9</b> : La mitochondrie au centre de l'homéostasie calcique. ....	30
<b>Figure 10</b> : Structure du mPTP (Adaptée de Kwong et Molkentin, 2014). ....	37
<b>Figure 11</b> : Rôles physiologiques du mPTP dans le cœur.....	39
<b>Figure 12</b> : Lésions mitochondriales au cours de l'ischémie-reperfusion.....	41
<b>Figure 13</b> : Différents types de conditionnement ischémique .....	44
<b>Figure 14</b> : Schéma simplifié des principales voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection : la voie SAFE (Survival Activation Factor Enhancement) et la voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase).....	46
<b>Figure 15</b> : Schématisation des mécanismes moléculaires impliqués dans le stockage des métabolites du NO.....	48
<b>Figure 16</b> : Synthèse du NO par la eNOS.....	50

<b>Figure 17</b> : Représentation des différents sites de phosphorylation de la eNOS et leur rôle dans l'activité de la protéine (Adaptée de Schulz et al., 2009). .....	51
<b>Figure 18</b> : (A-E)- Localisation de la eNOS sur la membrane externe de mitochondries isolées de cellules endothéliales (HUVEC). Les images sont obtenues par microscopie immunoélectronique, la eNOS est marquée avec un anticorps anti-eNOS. (F)- Un traitement à la protéinase K abolie en grande partie le marquage de la eNOS à la membrane externe mitochondriale (Gao et al., 2004).....	55
<b>Figure 19</b> : Impact du NO et de la S-nitrosylation sur la mitochondrie. ....	58
<b>Figure 20</b> : Ciblage de la mitochondrie par des cations TPP <sup>+</sup> conjugués à des antioxydants (Adapté de Apostolava et Victor, 2015). .....	61
<b>Figure 21</b> : Synthèse de cations lipophiles couplés à un antioxydant capable de cibler le stress oxydant mitochondrial. La chaîne respiratoire mitochondriale produit du superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ), qui peut libérer du fer ferreux, se dismuter en d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ; puis via la réaction de Fenton former du radical hydroxyle (OH <sup>-</sup> ) et conduire à la peroxydation lipidique (Adaptée de Murphy et Smith, Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2007). .....	62
<b>Figure 22</b> : Exemples de peptides SS ciblant la mitochondrie (Szeto et., 2006) .....	65
<b>Figure 23</b> : Mécanisme d'action des peptides SS (Adaptée de Broome et al., 2008). .....	65
<b>Figure 24</b> : Design experimental de l'ETUDE n°1. ....	92
<b>Figure 25</b> : Design expérimental de l'ETUDE n°2. ....	94
<b>Figure 26</b> : Poste de cœur isolé de Langendorff. ....	97
<b>Figure 27</b> : Représentation du protocole expérimental de cœur isolé perfusé de l'ETUDE n°1. ....	98
<b>Figure 28</b> : Représentation du protocole expérimental de coeur isolé perfusé de l'ETUDE n°2. ....	99
<b>Figure 29</b> : Exemple de tracé de pression obtenu au cours d'un protocole d'IR sur cœur perfusé de Langendorff .....	99
<b>Figure 30</b> : Protocole d'évaluation de la production d'ERO tissulaires au cours de la reperfusion post-ischémique .....	100

<b>Figure 31</b> : Impact du tempol sur la production d'ERO tissulaires évaluées par fluorescence à la DHE. (*p<0,05, test t).....	101
<b>Figure 32</b> : Protocole de la mesure de l'entrée de la sinapine dans les cardiomyocytes. ....	103
<b>Figure 33</b> : Protocole de la production de EROmt réalisé au cours de l' <b>ETUDE n°1</b> .....	104
<b>Figure 34</b> : Protocole de la production de EROmt réalisé au cours de l' <b>ETUDE n°2</b> .....	105
<b>Figure 35</b> : Mesure de la production de NO par microscopie à fluorescence , sur des cardiomyocytes stressés ou non avec de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et traités ou non avec de la L-NAME.....	106
<b>Figure 36</b> : Mesure de la production de NO par spectrofluorimétrie sur des cardiomyocytes pré-incubés (courbe bleu) ou non (courbe grise) avec de la L-NAME (100 µM).....	107
<b>Figure 37</b> : Image confocale de cardiomyocyte isolé chargé simultanément avec du DAF2 (canal vert, Em : 491nm ; Ex :513nm, 5µM) et du Mitotracker Orange (canal rouge, Ex :554nm ; Em : 576nm , 200nM). La colocalisation est représentée par une coloration orange. ....	108
<b>Figure 38</b> : Procédure d'isolement des deux fractions mitochondriales. ....	110
<b>Figure 39</b> : Contenu protéique des différentes fractions subcellulaire évalué par Western-blot. VDAC est utilisé comme marqueur spécifique des mitochondries, GAPDH comme marqueur spécifique des de la fraction cytosolique et Cx43 comme marqueur spécifique des SSM. ....	111
<b>Figure 40</b> : <b>Mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries. (A)</b> Principe du test de CRC. <b>(B)</b> Procédure des pulses de calcium sur mitochondries isolées, <b>(C)</b> test de CRC réalisé en présence (tracé violet) ou non (tracé noir) d'un inhibiteur du mPTP, la CsA (2 µM). ....	113
<b>Figure 41</b> : Contrôle du protocole de "swelling" mitochondrial. (A) Effet de doses croissantes de Ca <sup>2+</sup> sur le phénomène de swelling mitochondrial. (B) "Swelling mitochondrial en réponse au Ca <sup>2+</sup> (250 µM) en présence ou non de de cyclosporine A (CsA; 2 µM) .....	114
<b>Figure 42</b> : Protocole expérimental de la méthode « TMT switch assay » permettant la détection des résidus protéiques s-nitrosylés. ....	117
<b>Figure 43</b> : Action mitochondriale de la sinapine : des effets bénéfiques pour la fonction cardiaque après ischémie-reperfusion.....	125

**Figure 44** : Représentation des effets d'une supplémentation en sinapine et de l'exercice physique sur la limitation du cercle vicieux entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et les ERO au niveau mitochondrial. .... 197

## **INDEX DES TABLEAUX**

**Tableau 1** : Protocole d'entraînement utilisé au cours de l'ETUDE n°2 ..... 95

# **INTRODUCTION GENERALE**

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, les pathologies cardiaques représentent la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde. Dans les pays industrialisés tels que la France, ces pathologies sont la seconde cause de mortalité derrière le cancer (Hunter and Reddy, 2013; Murray and Lopez, 1997).

Parmi ces pathologies l'infarctus du myocarde reste une des plus meurtrières. En France, plus de 120 000 cas sont recensés chaque année, parmi lesquels 18 000 sont reportés comme mortels (Haute autorité de santé, 2007). Bien que le nombre de décès lié à ce type d'accident ischémique aigu ait fortement diminué ces dernières années, il représente un enjeu de santé publique, notamment dans les pays industrialisés où l'incidence de la pathologie est en constante augmentation, en raison d'une population vieillissante, d'habitudes alimentaires néfastes et d'une augmentation de la sédentarité (Puymirat, 2012).

L'infarctus du myocarde résulte d'une occlusion totale ou partielle d'une artère coronaire aboutissant à un déséquilibre entre les besoins en substrats énergétiques et les apports. S'il n'est pas pris en charge rapidement, ce phénomène qualifié d'ischémie myocardique peut conduire à des lésions non réversibles du tissu cardiaque et à l'apparition d'une zone infarctée. L'étendue de cette zone est intimement liée à la taille de la zone ischémisée ainsi qu'à la durée de l'ischémie, et représente un élément essentiel dans le pronostic vital des patients.

Dès lors, la seule intervention possible afin de réduire la sévérité de l'infarctus en limitant la mort cellulaire au cours de l'ischémie, s'avère être la reperfusion. Celle-ci consiste à rétablir le flux sanguin par angioplastie ou thrombolyse afin de reperfuser le muscle cardiaque. Bien que la reperfusion ait fait l'objet de nombreuses avancées thérapeutiques, pharmacologiques et chirurgicales au cours de ces dernières décennies, celle-ci est toujours à l'origine de lésions qui lui sont propres, dont la plus importante est l'accélération de la mort cellulaire dans les toutes premières minutes de cette reperfusion (Fliss and Gattinger, 1996; Murphy and Steenbergen, 2008). C'est pourquoi la reperfusion post-ischémique est qualifiée « d'épée à double tranchant ». En effet, elle est à la fois essentielle afin de limiter l'étendue des lésions induites par l'ischémie, mais engendrera dans un premier temps des lésions qui lui sont propres (Braunwald and Kloner, 1985). On parle aujourd'hui de syndrome d'ischémie-reperfusion (IR).

La mitochondrie est aujourd'hui largement décrite comme jouant un rôle clé dans ces lésions observées dès la restauration du flux sanguin et donc du flux énergétique. En effet, au cours de la

reperfusion post-ischémique, les dysfonctions mitochondriales sont notamment caractérisées par **i)** une surcharge calcique au niveau de la matrice mitochondriale et **ii)** une importante fuite d'électrons de la chaîne de transfert des électrons aboutissant à une exacerbation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La mise en place d'un cercle vicieux entre ces deux phénomènes va aboutir à l'activation durable du mégapore de transition de perméabilité mitochondrial : le mPTP (Hunter and Haworth, 1979). Une fois activé, ce dernier va conduire à une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), à un arrêt de la synthèse d'adenosine triphosphate (ATP) et à un gonflement de la matrice causé par une entrée massive d'eau et d'ions dans la mitochondrie pouvant aboutir à la rupture des membranes mitochondriales et à la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques. Ainsi, l'activation de ce mPTP est aujourd'hui reconnue comme participant de manière majeure à la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique (Halestrap et al., 2004). La mitochondrie et le mPTP sont ainsi considérés comme des cibles clés afin de limiter la sévérité des lésions de reperfusion. En conséquence, il semble important de pouvoir moduler l'activation du mPTP en situation de stress en limitant l'établissement de ce cercle vicieux entre surproduction d'ERO mitochondriales (EROMt) et surcharge de calcium ( $Ca^{2+}$ ).

**Ainsi l'objectif de cette thèse a été de développer des stratégies naturelles permettant de limiter la surproduction d'ERO mitochondriales en augmentant dans le même temps le niveau de compréhension des mécanismes sous-jacents à ces stratégies notamment par une étude de leurs conséquences sur la mitochondrie.**

Parmi les stratégies existantes, il est largement démontré qu'une alimentation riche en antioxydants naturels réduit le risque relatif de mortalité dans de nombreuses pathologies et notamment dans les maladies cardiovasculaires (Bjørklund and Chirumbolo, 2017; Nuttall et al., 1999; Omenn et al., 1996). Ainsi, dans des modèles expérimentaux, de nombreux antioxydants naturels ont été rapportés comme permettant de limiter la sévérité des lésions d'IR (i.e flavonoïdes : extrait du *Dracocephalum moldavica* et le resveratrol, présent dans le raisin) (Hung et al., 2000; Jiang et al., 2014). Néanmoins, les effets bénéfiques de ces stratégies basées sur l'utilisation de composés naturels n'ont pour le moment pas été confirmés par des études cliniques (Miller et al., 2005). De manière générale, il semble que l'utilisation d'antioxydants lors de l'IR ne soit pas efficace afin de limiter les lésions de

reperfusion (Marczin et al., 2003). Plus récemment, compte tenu du rôle clé de la mitochondrie dans les lésions d'IR, des molécules permettant de cibler la production d'ERO au niveau mitochondrial ont été développées et suscitent un intérêt croissant. Ainsi, l'équipe de M. Murphy au mitochondrial Research Center de Cambridge a développé un cation lipophile, le triphénylphosphonium (TPP<sup>+</sup>), sur lequel ils sont capables de « greffer » des molécules telles que des antioxydants, des donneurs de monoxyde d'azote (NO) ou même d'y incorporer des sondes fluorescentes. Le  $\Delta\Psi_m$  étant extrêmement électronégatif, les cations lipophiles peuvent alors, en utilisant cette force électromotrice, s'accumuler dans les mitochondries. Cette stratégie offre ainsi un moyen très sélectif de fournir des antioxydants cationiques aux mitochondries afin de cibler les ERO directement au niveau de leurs sites de production. De nombreux dérivés de ces conjugués TPP<sup>+</sup> ont émergé et se sont montrés efficaces pour limiter la production d'EROmt. On retrouve le TPP<sup>+</sup>-ubiquinone : MitoQ (Kelso et al., 2001), le TPP<sup>+</sup>-tocophérol (Smith et al., 1999) et le MitoTEMPO (Ni et al., 2016a; Vendrov et al., 2015). A ce jour, les seuls antioxydants rapportés comme permettant de cibler la mitochondrie sont donc des antioxydants de synthèse. Cependant, il n'y a aucune raison de penser que les propriétés chimiques permettant à ces molécules de cibler la mitochondrie ne soient pas également présentes à l'état naturel.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la première étude de cette thèse réalisée en collaboration avec la société Naturex (leader mondial des extraits naturels), et qui s'intéresse à l'utilisation d'un antioxydant naturel ciblant la mitochondrie. L'objectif étant de pouvoir cibler directement le stress oxydant mitochondrial afin de prévenir la mise en place du cercle vicieux entre EROmt et Ca<sup>2+</sup>. Pour cela, nous avons pu identifier un antioxydant naturel, la sinapine, présente en quantité importante dans les plantes de la famille des *Brassicaceae*, dont les plus connues sont le colza et la moutarde. La sinapine est un ester de choline de l'acide sinapique, contenant donc une amine quaternaire chargée positivement associée à un groupement phénol. Ces caractéristiques chimiques de la sinapine suggèrent que celle-ci pourrait avoir un fort tropisme mitochondrial.

L'objectif de cette première étude de thèse a donc été d'évaluer **1)** la capacité de la sinapine à entrer dans les cardiomyocytes pour y limiter le stress oxydant mitochondrial et **2)** de déterminer les effets antioxydants de cette molécule au cours d'un syndrome d'IR myocardique (**Etude 1**).

Parmi les stratégies naturelles capables d'induire une cardioprotection, l'exercice physique est aujourd'hui reconnu comme étant certainement la plus efficace. En effet, il est intéressant de noter que les effets cardioprotecteurs de l'exercice physique sont aussi bien observés dans des modèles expérimentaux de rongeurs (Farah et al., 2013, 2017; Kleindienst et al., 2016) que dans des études cliniques (Ejlersen et al., 2017a; Marongiu and Crisafulli, 2014; Peytz et al., 2019). Les effets bénéfiques de la pratique régulière d'une activité physique sur la santé cardiovasculaire ont été largement décrits (Ignarro et al., 2007; Warburton et al., 2006) et font désormais partie des recommandations de l'organisation mondiale de la santé. Néanmoins, les mécanismes physiologiques et cellulaires sous-jacents permettant d'expliquer les effets bénéfiques de l'exercice physique sur le cœur demeurent mal compris (Powers et al., 2008). Récemment, il a été rapporté que cette cardioprotection était fortement dépendante de la synthèse de NO par la nitrique oxyde synthétase endothéliale (eNOS) (Calvert John W. et al., 2011; Farah et al., 2013). En effet, l'exercice physique perd toute son efficacité lorsqu'il est conduit chez des souris déficientes pour le gène de la eNOS ou pour le récepteur  $\beta_3$  adrénergique (reconnu comme permettant l'activation de la eNOS en réponse à l'exercice physique) (Calvert John W. et al., 2011). L'exercice permet via l'activation de la eNOS d'augmenter la biodisponibilité du NO et la S-nitrosylation de nombreuses protéines, notamment au cours des toutes premières minutes de la reperfusion (Calvert John W. et al., 2011; Farah et al., 2013). Bien que le NO puisse impacter de manière non négligeable la fonction mitochondriale, les effets de l'exercice physique sur la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial n'ont à ce jour pas été investigués.

Une étude récente menée par Sun et ses collaborateurs, a démontré qu'une stratégie de préconditionnement ischémique (PreC) est à l'origine d'une translocation de la eNOS vers les mitochondries sub-sarcolemmales (SSM) (Sun et al., 2015a). Cette stratégie aboutit à une augmentation de la S-nitrosylation des protéines mitochondriales et diminue l'activation du mPTP au cours d'un stress calcique (Sun et al., 2015a). De plus, Chouchani et al. (2013) ont pu montrer que l'utilisation de mitoSNO, un donneur de NO ciblant les mitochondries, permet d'augmenter la S-nitrosylation de protéines mitochondriales impliquées dans la surproduction d'ERO au cours de la reperfusion et ainsi de limiter la sévérité des lésions de reperfusion (Chouchani et al., 2013).

Ainsi la deuxième étude de ce travail de thèse a eu pour objectif d'évaluer **1)** l'impact de l'exercice physique sur la biodisponibilité du NO au niveau des mitochondries cardiaques et ainsi **2)** évaluer le rôle du NO dans la modulation de l'établissement d'un cercle vicieux entre production d'ERO et surcharge calcique en réponse à un stress (**Etude n°2**).

# REVUE DE LITTERATURE

## Chap 1 : Ischémie- Reperfusion : Place de la mitochondrie dans ce phénomène

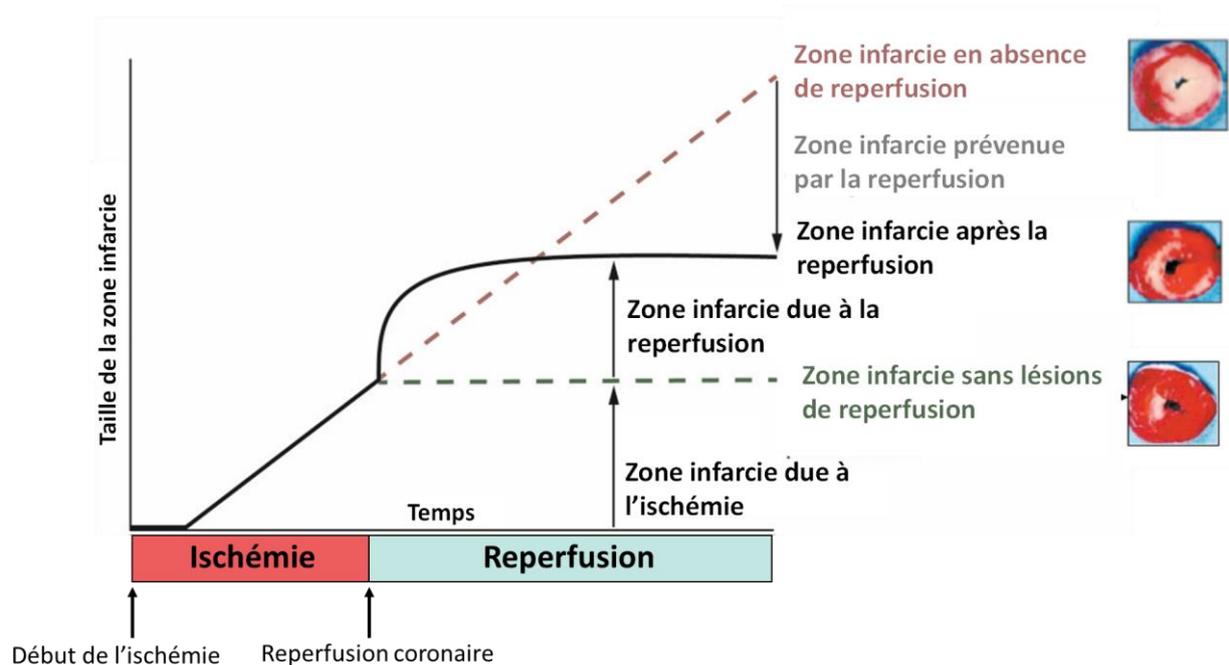
### I. Ischémie-reperfusion myocardique : Généralités

#### 1. Définition et généralités

L'ischémie se définit comme un déséquilibre entre les besoins en O<sub>2</sub> et en nutriments du muscle cardiaque et leurs apports par la circulation artérielle 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 aboutissant à une réduction ou un arrêt du flux sanguin coronaire. La sévérité des lésions liées à l'ischémie va dépendre de l'étendue de la zone ischémisée et de la durée de l'ischémie (De Luca Giuseppe et al., 2004; Reimer and Jennings, 1979; Reimer et al., 1977). Une courte durée d'ischémie n'induit généralement que peu de conséquences néfastes et irréversibles. En revanche, si l'ischémie est maintenue pendant un laps de temps plus important, elle va être à l'origine de désordres de l'homéostasie cellulaire conduisant à des complications rythmiques et à la mort des cellules contractiles du myocarde aboutissant *in fine* à l'établissement d'une zone infarctée. La restauration du flux sanguin s'avère cruciale afin de sauver le myocarde et constitue à ce jour la seule intervention efficace, on parle alors de reperfusion (*Figure 1*). Depuis plus de 20 ans, plusieurs méthodes ont été développées afin de restaurer le flux sanguin et permettre l'optimisation de la reperfusion post-ischémique (Braunwald, 2011; Ivanov et al., 2010). Parmi les méthodes aujourd'hui employées on retrouve : l'utilisation d'agents thrombolytiques permettant la dissolution chimique du caillot sanguin, la réalisation d'une angioplastie coronaire permettant d'élargir mécaniquement le diamètre de l'artère ou encore la réalisation d'un pontage coronarien. Comme évoqué précédemment, bien qu'elle soit indispensable à la survie du myocarde, la reperfusion est considérée comme « une épée à double tranchant » (Jennings and Reimer, 1983; Verma et al., 2002) car elle se retrouve associée à des lésions qui lui sont propres (Braunwald and Kloner, 1985) regroupées sous le terme de lésions de reperfusion (*Figure 1*). Les lésions de reperfusion constituent une fenêtre d'action thérapeutique afin de tenter de limiter la sévérité de l'infarctus.

Il est courant de considérer les lésions dues à l'IR comme une entité composite puisque la reperfusion ne peut jamais se produire indépendamment de l'ischémie. Afin de mieux comprendre les

dysfonctions liées à l'IR et de manière à décrire précisément les événements liés à l'ischémie et ceux survenant lors de la reperfusion, les deux phénomènes seront décrits indépendamment l'un de l'autre.



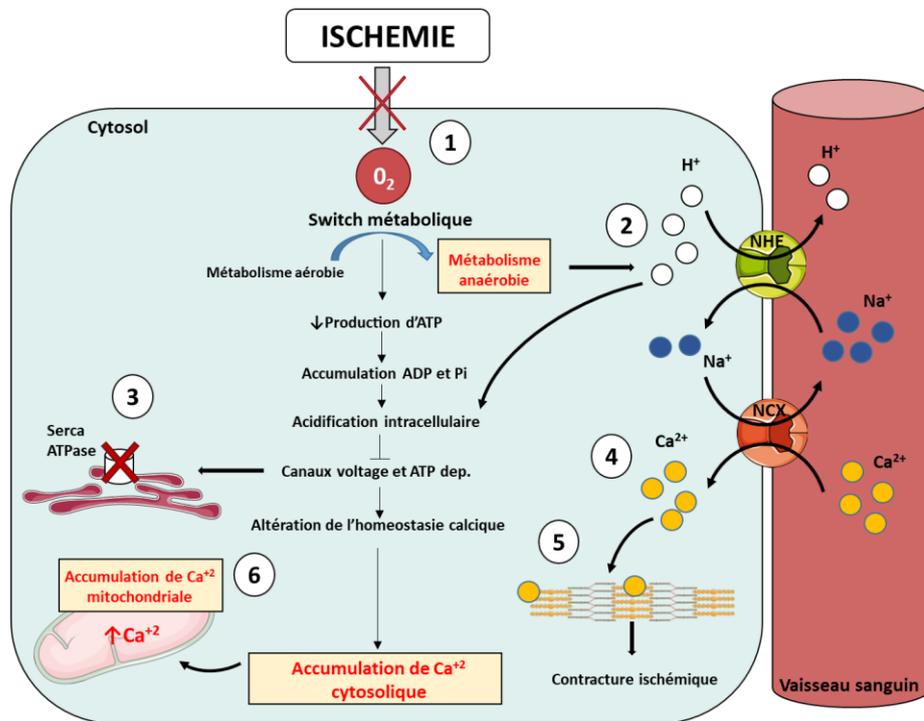
**Figure 1 :** La reperfusion post-ischémique, une épée à double tranchant dans la survie du tissu myocardique (Adaptée de Hausenloy et al., 2013)

## 2. Lésions d'ischémie

En condition physiologique, lorsque le flux sanguin coronaire assure un apport adéquat en oxygène ( $O_2$ ) et en nutriments au tissu cardiaque, l'énergie (synthétisée sous forme d'ATP) requise pour l'activité contractile du myocarde est essentiellement dépendante du métabolisme oxydatif. Cependant en condition ischémique, l'apport en  $O_2$  devient insuffisant pour permettre la respiration cellulaire (*Figure 2-(1)*). La conséquence immédiate est un ralentissement de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc la diminution de la production d'ATP. La glycolyse anaérobie se met alors en place dans les 30 secondes suivant l'occlusion de l'artère coronaire (Jennings and Reimer, 1983). Toutefois, son apport énergétique reste insuffisant pour permettre un fonctionnement normal du

cœur et conduit à une acidose cellulaire délétère pour la cellule (*Figure 2-(2)*). Afin de limiter la baisse du pH, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) s'active afin d'expulser les protons. Néanmoins, ce mécanisme de régulation va aboutir à une accumulation intracellulaire en ions  $\text{Na}^+$  (Kloner and Jennings, 2001; Manning et al., 1984) exacerbée par l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et ainsi engendrer l'activation en mode « reverse » de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). Ceci a finalement comme conséquence une augmentation marquée de la concentration calcique cytosolique (Allen and Xiao, 2003) (*Figure 2-(4)*). Il a également été démontré qu'une augmentation de la concentration intracellulaire en adénosine diphosphate (ADP), reflétant une altération du statut énergétique cellulaire, est à l'origine d'une libération des stocks intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique (RS) (Meis and Vianna, 1979). Cette surcharge calcique est la cause de nombreux dommages cellulaires durant l'ischémie expliqués notamment par une sur-activation des calpaines (Garcia-Dorado et al., 2012; Inseret et al., 2012), une production résiduelle d'ERO mitochondriales et une contracture ischémique (*Figure 2-(5 et 6)*). Ces désordres cellulaires vont finalement aboutir à une mort des cellules par nécrose (pour plus de détails sur la nécrose voir *Chap1/I/3/3.4.1*) (Allen and Xiao, 2003) (pour un résumé voir *Figure 2*).

Au cours d'une ischémie de courte durée (moins de 15 minutes), les lésions sont qualifiées de réversibles. En effet, lors de la reperfusion les cellules de la zone ischémisée retrouveront un métabolisme normal dans les heures ou dans les jours suivants cette reperfusion (Kloner and Jennings, 2001). À contrario, pour une ischémie de plus longue durée (supérieure à 15 minutes), un phénomène de mort cellulaire est mis en place ayant pour conséquence l'apparition d'une zone infarctée plus connue sous le nom d'infarctus (Bolli and Marbán, 1999). À l'échelle tissulaire, ces lésions sont notamment caractérisées par la présence d'inclusions intra-mitochondriales denses et de ruptures membranaires pouvant mener à la fuite de composants cellulaires et à une anarchie architecturale (Allen and 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 (Reimer and Jennings, 1979).



**Figure 2 :** Schéma représentant les principales modifications au sein du cardiomyocyte au cours de l'ischémie (Adaptée de Hausenloy et al., 2013).

### 3. Lésions de reperfusion

La reperfusion coronaire bien que nécessaire afin de sauver le tissu ischémié, entraîne paradoxalement une aggravation des désordres cellulaires provoquée lors de l'ischémie (*Figure 1*). Les désordres liés à la reperfusion ont été décrits pour la première fois par Jennings et ses collaborateurs en 1960 (Jennings et al., 1960). Ils ont rapporté que la reperfusion était à l'origine d'un gonflement des cellules cardiaques, associé à une altération du sarcolemme ainsi qu'à une contracture des myofibrilles. Tout ceci conduit à l'établissement de quatre types de lésions cardiaques : i) un phénomène de sidération myocardique, qui correspond à un dysfonctionnement mécanique qui

persiste après la reperfusion malgré l'absence de dommages irréversibles et malgré la restauration d'un flux coronaire normal (Braunwald and Kloner, 1982) ; **ii**) un phénomène de « no-reflow », défini comme l'incapacité de reperfuser une région précédemment ischémisée ; **iii**) L'apparition de troubles du rythme ; et **iv**) une exacerbation de la mort cellulaire lors des premières minutes de la reperfusion. Même si les quatre lésions seront décrites par la suite, l'exacerbation de la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique semble à ce jour représenter la principale complication du syndrome d'IR.

### 3.1. La sidération myocardique

Le « stunning » ou sidération myocardique, caractérisé pour la première fois par Heyndrick et al. (1975), définit l'état d'une ou plusieurs zones du myocarde qui présentent une contractilité anormale à la suite d'une occlusion coronaire et qui persiste à la reperfusion en dépit d'un débit de reperfusion normal. La sévérité de ce phénomène est dépendante de plusieurs facteurs tels que la durée de l'ischémie, la taille de la zone ischémisée et les conditions de charges (Bolli, 1995). Parmi les nombreux mécanismes responsables de cette sidération myocardique proposés dans la littérature scientifique, les plus connus sont : **i**) la surcharge calcique, en lien avec l'altération du couplage excitation-contraction (CEC) des cardiomyocytes et **ii**) la production d'ERO (Bolli and Marbán, 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, à l'origine d'une altération de la contraction des cardiomyocytes (Valverde et al., 2010). Par ailleurs, en plus d'être impliquées dans les troubles de l'homéostasie calcique cellulaire, les ERO produites en début de reperfusion ont également pour cibles les protéines contractiles. En effet, l'oxydation des myofilaments est à l'origine d'une altération de leur contractilité (Gao et al., 1995). La dissipation de ces altérations de contractilité ventriculaire post-ischémique peut nécessiter un délai allant de quelques heures à plusieurs jours selon la sévérité de l'ischémie.

### 3.2. Le phénomène de no-reflow

Le phénomène de « no-reflow » défini pour la première fois par Kloner et al. (1974) est caractérisé par l'absence du rétablissement immédiat de la perfusion coronaire après reperfusion du territoire myocardique préalablement ischémié (Kloner et al., 1974). En termes de dommages « anatomiques », d'après les études menées sur ce phénomène, il semble que la gravité du « no-reflow » puisse s'expliquer par différents phénomènes, tels qu'un gonflement des cellules endothéliales et l'apparition d'œdèmes cellulaires à l'origine d'une compression des microvaisseaux. 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 d'ERO par les neutrophiles circulants ainsi que par les cellules endothéliales elles-mêmes (Schwartz and Kloner, 2012). En effet, il a été rapporté que l'altération de la fonction endothéliale lors de l'IR est responsable d'une réduction de libération de NO (Farah et al., 2017). La moindre biodisponibilité du NO vasculaire, connu pour ses propriétés vasodilatatrices (Furchgott and Zawadzki, 1980), contribue à augmenter l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire et favorise le phénomène de « no reflow » (Ma et al., 1993).

### 3.3. Les troubles du rythme liés à la reperfusion

La reperfusion est également associée à des troubles du rythme allant de l'extrasystole à la fibrillation ventriculaire réversible ou irréversible, pouvant mener à la mort du sujet (Manning et al., 1984). Ces phénomènes arythmiques semblent surtout apparaître durant les premières minutes de la reperfusion et semblent être influencés par différents facteurs comme la durée de l'ischémie et le stress oxydant (Nakaya et al., 1992). Ces troubles du rythme cardiaque trouvent leurs origines dans les altérations du potentiel de membrane associées aux modifications des concentrations ioniques intracellulaires lors de l'ischémie myocardique (Corr and Witkowski, 1983). Il est également rapporté que les cellules proches de la zone infarctée sont plus sensibles aux courants réentrants favorisant ainsi l'apparition d'évènements arythmiques (Ideker et al., 1981). Finalement, les lésions dues à la reperfusion et leurs conséquences sur l'hétérogénéité fonctionnelle et structurelle de la paroi du muscle cardiaque peuvent favoriser les phénomènes arythmiques.

### 3.4. La mort cellulaire myocardique

De par ses conséquences irréversibles, la mort cellulaire représente la principale complication du syndrome d'IR. Elle est due dans un premier temps à l'ischémie elle-même puis à la reperfusion qui pour rappel est à l'origine de lésions qui lui sont propres. La mort des cardiomyocytes au cours de l'IR résulte de 4 processus différents que sont la nécrose, l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose (Chiong et al., 2011).

#### 3.4.1. Nécrose

Dans les premières minutes de la reperfusion, un mécanisme de mort cellulaire par nécrose se met en place. Ce phénomène au cours de l'IR résulte principalement de la déplétion en ATP survenant au cours de l'ischémie, responsable d'une incapacité de la cellule à maintenir son activité vitale. En effet, l'inactivation des canaux ioniques ATP-dépendants au cours de l'ischémie conduit **i)** à une altération de l'homéostasie ionique cellulaire conduisant à la contracture et au gonflement des cardiomyocytes, **ii)** à des altérations de l'intégrité des membranes cellulaires et finalement **iii)** à une rupture létale de la cellule (Murphy and Steenbergen, 2008) (*Figure 3-A*). La mort des cellules par nécrose a notamment comme conséquence majeure l'activation d'une réponse inflammatoire. De plus, la surcharge calcique au cours de l'IR peut induire une activation des calpaines également impliquées dans une protéolyse et finalement dans des 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 d'ERO vont prolonger ce processus nécrotique en activant le mPTP (Murphy and Steenbergen, 2008). Ainsi, la mitochondrie et l'activation du mPTP sont aujourd'hui reconnues comme étant des acteurs majeurs de la mort cellulaire par nécrose au cours de l'IR (Murphy and Steenbergen, 2008). Le mécanisme de mort cellulaire associé à l'ouverture du mPTP sera détaillé dans le *Chap 1/II/2/2.3*.

#### 3.4.2. Apoptose

L'apoptose est définie comme le processus de mort cellulaire « programmée » pouvant être activé par différents facteurs (Kerr et al., 1972). Elle est régulée par la balance entre facteurs de mort

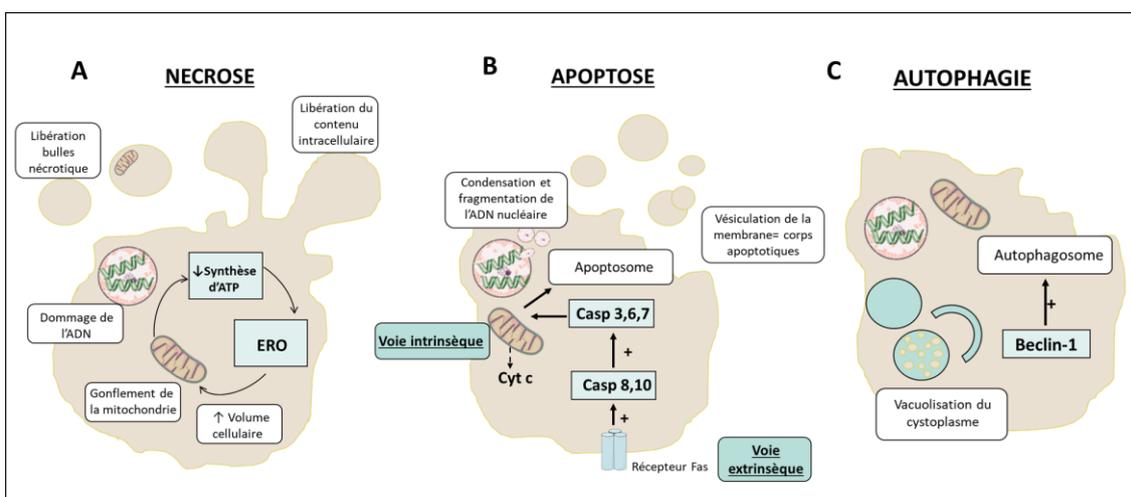
(facteurs pro-apoptotiques : Bid, Bax et Bak) et signaux de survie cellulaire (facteurs anti-apoptotiques : Bcl-2 et Bcl-xL). Elle consiste en une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et de la chromatine nucléaire, une fragmentation internucléosomique de l'ADN, un rétrécissement cellulaire sans relargage du matériel intracellulaire et la formation de protubérances au niveau de la membrane plasmique conduisant à la formation de corps apoptotiques qui seront ultérieurement phagocytés (*Figure 3-B*). Le signal de mort cellulaire au cours de l'apoptose est essentiellement transmis par l'activation des caspases, une famille de protéases à cystéine, responsable du clivage de l'ADN et des composants protéiques essentiels à la survie cellulaire (van Gurp et al., 2003; McIlwain et al., 2013). En effet, celles-ci sont synthétisées sous forme inactive de pro-caspase dans le cytosol. Une fois la voie des caspases activée, les caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10), clivent les caspases effectrices (caspases 3 et 7), elles-mêmes capables d'inactiver l'enzyme poly ADP-ribose polymérase (PARP), provoquant la fragmentation de l'ADN par les endonucléases. Les mécanismes qui conduisent à la mort cellulaire au cours de l'IR ne sont pas complètement élucidés. Néanmoins, on sait aujourd'hui que le processus d'apoptose implique 2 voies bien distinctes : **i) une voie extrinsèque** et une **ii) voie intrinsèque**. La **voie extrinsèque** correspond à un processus non mitochondrial, lié aux récepteurs membranaires, impliquant principalement le récepteur Fas. En effet, son activation induit la formation de la caspase 8, elle-même responsable de l'activation de la caspase 3, véritable plaque tournante de la signalisation apoptotique (Tummers and Green, 2017). La **voie intrinsèque** quant à elle, implique la mitochondrie (Crow et al., 2004; Wang and Youle, 2009) (*Figure 3-B*). En effet, l'activation du mPTP provoque la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie dont les plus connus sont le cytochrome c (cyt c) et l'AIF (Facteur d'induction de l'apoptose) (Kinnally et al., 2011; Wang, 2001). Cette phase de libération est contrôlée par des protéines de la famille des Bcl-2. Ainsi, Bax est capable d'induire la libération du cyt c, tandis que Bcl-2 peut la bloquer. Dans le cytosol, le cyt c interagit avec l'Apoptotic Protease Activating Factor 1 (APAF-1), formant un complexe appelé l'apoptosome. Ce complexe active ensuite la caspase 9, elle-même capable d'activer la caspase 2 induisant la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire par apoptose (Boatright and Salvesen, 2003).

Pendant longtemps, la communauté scientifique pensait que la mort cellulaire des cardiomyocytes suite à l'IR était exclusivement nécrotique. De nombreuses études confirment aujourd'hui que l'ischémie à elle seule peut déclencher l'apoptose et que la reperfusion accélère ce processus apoptotique (Eefting et al., 2004; Fliss and Gattinger, 1996). Ceci s'explique principalement

par une augmentation de la surcharge calcique et de la production d'ERO au cours de l'IR (Fliss and Gattinger, 1996; Webster, 2012).

### 3.4.3. Autophagie

L'autophagie est un processus physiologique mis en jeu afin d'éliminer les organites et/ou les macromolécules cellulaires endommagés afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. On sait aujourd'hui que ce processus de mort cellulaire est potentialisé au cours de l'IR, néanmoins son rôle fait l'objet de controverses (Przyklenk et al., 2012). En effet, l'induction de l'autophagie peut être protectrice ou délétère selon le modèle d'étude (Gustafsson and Gottlieb, 2009). Certaines études suggèrent que les voies intracellulaires de l'autophagie mises en jeu au cours de l'ischémie et de la reperfusion ne sont pas les mêmes. Durant les premières minutes de la reperfusion, l'autophagie exacerbe la mort cellulaire, via l'activation de Beclin 1. Des facteurs comme l'augmentation des ERO, un stress du réticulum endoplasmique ou encore une augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire contribuent à expliquer ce phénomène (*Figure 3-C*) (Gottlieb and Mentzer, 2010). Au cours de l'ischémie, la déplétion en ATP conduit à une autophagie induite par l'activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK) qui semblerait pouvoir être cardioprotectrice. Un autre acteur principal de l'activation de l'autophagie au cours de l'ischémie est Bnip3. Ainsi, il semblerait que l'autophagie soit un processus bénéfique au maintien de l'homéostasie cellulaire en cas de réponse à un stress ischémique modéré, mais puisse devenir délétère en cas de stimulation excessive induite par une ischémie prolongée et une production exacerbée d'ERO au cours de la reperfusion (*Figure 3-C*).



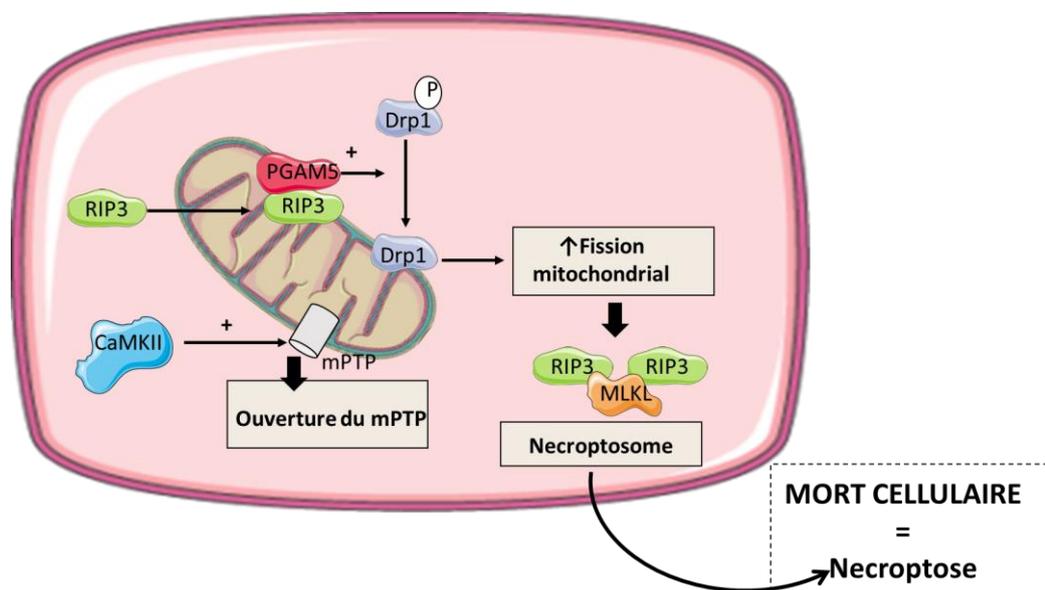
**Figure 3** : Les différents types de mort cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion.

#### 3.4.4. Necroptose

Ces dernières années, de nombreux chercheurs ont mis en évidence un nouveau mécanisme de mort cellulaire au cours de l'IR : la nécroptose. Cette forme de nécrose programmée est caractérisée par un dysfonctionnement mitochondrial, une forte production d'ERO, un gonflement des cellules, une rupture de la membrane plasmique et un relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire (Adameova et al., 2016, 2017). Tout comme l'apoptose, celle-ci est programmée mais présente néanmoins des caractéristiques similaires à la nécrose (Vandenabeele et al., 2010). Elle doit être distinguée de la nécrose classique, puisqu'elle est activée par des facteurs bien spécifiques (Vandenabeele et al., 2010). En effet, on sait aujourd'hui que 2 voies distinctes peuvent être impliquées dans la nécroptose : **i)** un mécanisme qui dépend de l'activation des récepteurs membranaires de mort (TNFR : Tumor necrosis factor receptor ou TRAILR : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et **ii)** un processus indépendant des récepteurs de mort (Toll-like (TLR)). Dans les deux cas ceci conduit à l'activation des kinases RIPK1 et RIPK3 (Receptor Interacting Protein Kinase) et à la formation d'un nécrosome (ou complexe IIB). L'une des cibles importantes de RIPK3 est la protéine MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like protein) qui s'oligomérisse et forme des pores dans les membranes intracellulaires et plasmiques, conduisant *in fine* à la mort cellulaire suite à une altération de la membrane plasmique. La nécroptose est stimulée dans des conditions où la caspase 8 n'est pas active ou n'est pas disponible et est inhibée par la nécrostatine, un inhibiteur de la kinase RIPK1.

Bien que le rôle de la nécroptose dans les lésions d'IR soit bien connu (Koshinuma et al., 2014), seul un nombre très limité d'études ont étudié l'importance des mitochondries dans ce phénomène (Davidson et al., 2020; Hou et al., 2018; Rohde et al., 2017). Il semblerait que l'ischémie et la reperfusion soient à l'origine d'une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de RIPK1 et RIPK3, mais également de l'expression de la MLKL et de PGAM5 (Serine/threonine-protein phosphatase), protéine déphosphorylante connue comme un régulateur clé de la dynamique mitochondriale. Au cours de l'IR, RIPK3 se transloque au niveau des mitochondries afin d'activer PGAM5 qui va elle-même déphosphoryler et activer Drp1 (Dynamin-1 like protein), conduisant à une fission des mitochondries synonyme d'une altération mitochondriale. De plus, certaines études démontrent que l'activation de CaMKII (Ca<sup>2+</sup>-calmodulin protein Kinase) par RIPK3 conduit à la nécroptose via l'activation du mPTP (*Figure 4*). Ceci est en accord avec certaines études qui suggèrent que l'ouverture du mPTP est nécessaire à l'induction de la nécroptose et que la cyclophyline D (régulateur clé du mPTP ; Cyp D) joue un rôle clé dans ce phénomène. En effet, l'utilisation de

nécrostatine (un inhibiteur de la kinase RIPK1), prévient la nécroptose chez des souris contrôle (Wild Type) mais n'a aucun effet chez des souris KO pour la Cyp D ( $CypD^{-/-}$ ). Ainsi, la Cyp D serait nécessaire à l'induction de la nécroptose, via l'activation du mPTP (Lim et al., 2007). Une autre étude menée par Hou et al. en 2018 (Hou et al., 2018), démontre que l'inhibition de RIP3 par un siRNA prévient la fragmentation mitochondriale en prévenant l'activation de Drp1. Tout ceci démontre que la dysfonction mitochondriale, observée au cours de l'IR, conduit finalement à la formation d'un nécroptosome constitué de RIP1, RIP3 et MLK et que tout ceci conduit à la mort cellulaire par nécroptose. Malgré tout, plus d'études sont nécessaires de manière à accroître la compréhension de ces mécanismes.

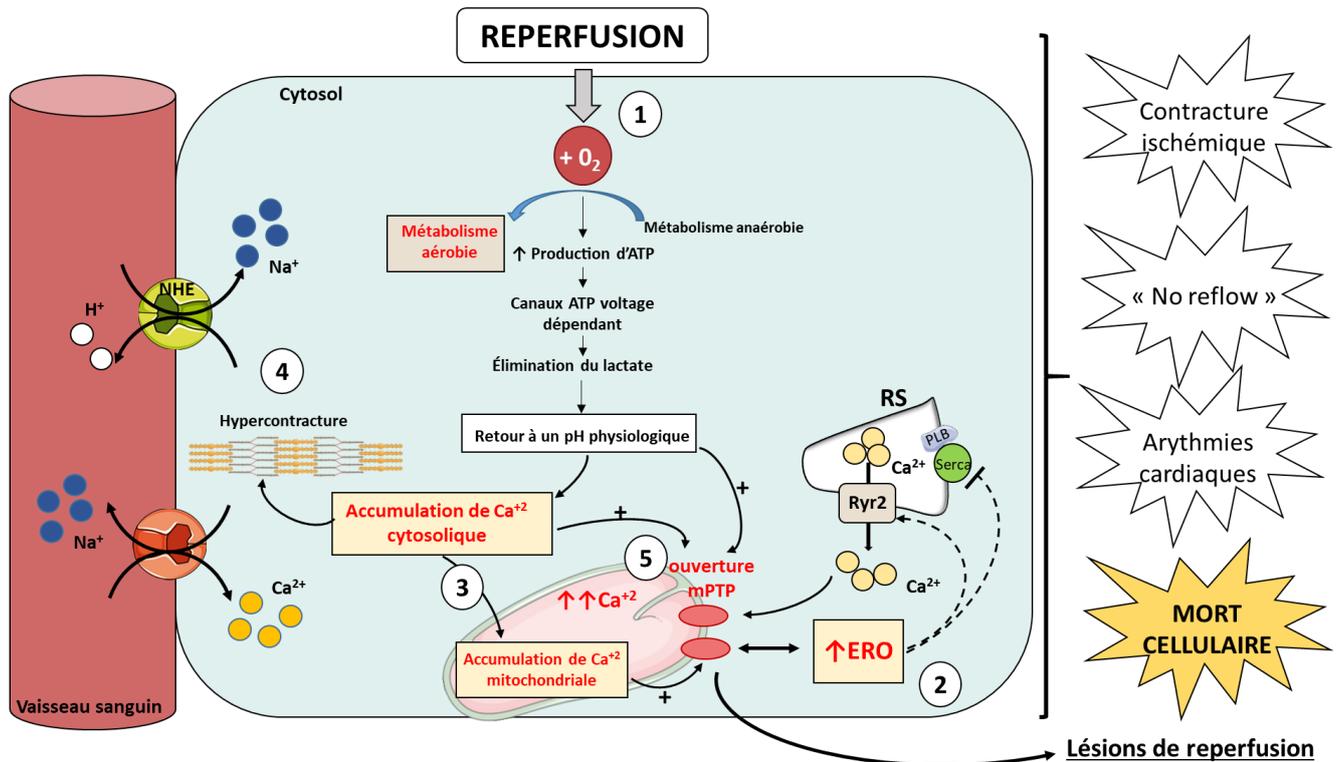


**Figure 4 :** Mécanismes d'induction de la nécroptose.

L'ensemble de ces données montrent que la mort cellulaire suite à l'ischémie reperfusion résulte d'un ensemble de mécanismes impliquant la nécrose, l'apoptose, l'autophagie et la nécroptose. La distinction entre ces différentes voies de mort cellulaire pourrait ne pas avoir de sens, puisqu'elles semblent être interconnectées et la mise en place de ces différents types de mort cellulaire semble en partie liée à l'environnement cellulaire (Golstein and Kroemer, 2007; Zong and Thompson, 2006). Le nombre considérable d'acteurs mis en jeu dans l'activation des voies de mort cellulaire au cours de l'IR ne nous permet pas d'en faire une description exhaustive dans ce manuscrit.

### 3.5. Les médiateurs de la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique

A l'échelle cellulaire, la réintroduction brutale d'O<sub>2</sub> (*Figure 5-(1)*) conduit à la production massive d'ERO, elles mêmes responsables d'un stress oxydatif délétère pour la cellule (*Figure 5-(2)*) (Zweier and Talukder, 2006). Ces dernières vont d'une part réduire la biodisponibilité de molécules endogènes cardioprotectrices comme le NO, altérer le fonctionnement du RS, induisant ainsi une surcharge calcique intracellulaire. Il semblerait que l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR), principaux canaux de libération de Ca<sup>2+</sup> par le RS, soit contrôlée par les ERO (Donoso et al., 2011). En effet, il a été démontré que la NADPH oxydase et le canal RyR sont tous les deux localisés au niveau des tubules transverses (tubule T) des cardiomyocytes (Prosser et al., 2011) et que la NADPH oxydase contrôlerait l'ouverture du RyR. Ainsi, l'augmentation de la production d'ERO après la reperfusion myocardique pourrait conduire à une augmentation de la libération de Ca<sup>2+</sup> par le RS. Cette augmentation de Ca<sup>2+</sup> cytosolique puis mitochondriale (aggravée par la réoxygénation de la chaîne respiratoire mitochondriale et la restauration du  $\Delta\Psi_m$ ) (*Figure 5-(3)*), ainsi que l'exacerbation de la production d'ERO vont dépasser les mécanismes d'adaptation cellulaire et entraîner d'une part, un phénomène de contracture sarcomérique (responsable de l'effet de sidération myocardique) (*Figure 5-(4)*) et, d'autre part, l'ouverture du mPTP (*Figure 5-(5)*). Celui-ci une fois activé, va conduire à la dissipation du  $\Delta\Psi_m$ , à un arrêt de la synthèse d'ATP et à un gonflement de la matrice causée par une entrée massive d'eau et d'ions dans la mitochondrie pouvant aller jusqu'à la rupture des membranes mitochondriales. Ceci pourra conduire à la libération de molécules pro-apoptotiques comme le cyt c ou l'AIF dans le cytosol et l'initiation de la mort cellulaire par apoptose (Halestrap et al., 2004) (*pour un résumé voir Figure 5*). Le rôle de la mitochondrie dans les lésions d'IR et dans les différentes stratégies de cardioprotection sera décrit plus en détail dans la partie *Chap 1/II* du manuscrit.



**Figure 5** : Schéma représentant les principales modifications cardiomyocytaires au cours de l'ischémie-reperfusion.

## II. La mitochondrie dans l'Ischémie-Reperfusion

### 1. Fonctionnement cardiaque et mitochondrie

Bien qu'il ne représente que 0,4% du poids d'un individu, le myocarde, est considéré comme le tissu le plus oxydatif du corps humain, puisqu'il utilise près de 11% de la consommation d' $O_2$  totale de l'organisme et que 90% de la production de l'énergie cardiaque provient du métabolisme oxydatif (Mootha et al., 1997; Rolfe and Brown, 1997). L' $O_2$  moléculaire est utilisé pour la synthèse d'ATP par les mitochondries. Celles-ci représentent 20 à 40% du volume cardiomyocytaire. Dans des conditions normales de contraction (normoxie), le myocarde, utilise environ  $1 \text{ mM ATP.s}^{-1}$  et ses faibles réserves en énergie (environ 8 mM d'ATP et 15 mM de phosphocréatine) ne lui permettent que quelques secondes d'autonomie. Ainsi, la phosphorylation oxydative (OXPHOS), représente le seul mécanisme

de synthèse d'ATP permettant un flux suffisant d'énergie, d'où la dépendance du cœur pour l'O<sub>2</sub> et l'importance des mitochondries dans la respiration cellulaire. Ainsi, toute altération du fonctionnement des mitochondries peut être fatale pour la survie de la cellule cardiaque.

## 1.1. Les mitochondries : Généralités

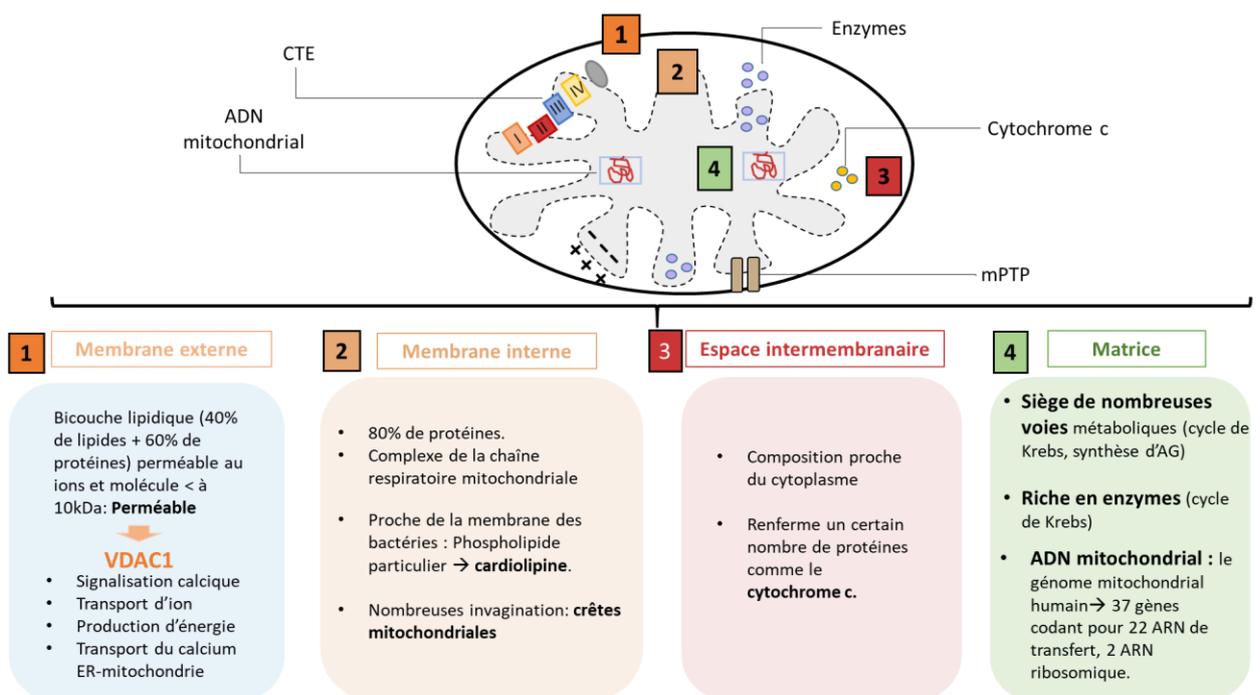
### 1.1.1. Origine

La théorie endosymbiotique développée dans les années 60 par Lynn Margulis est aujourd'hui communément acceptée afin d'expliquer l'origine des mitochondries. En effet, celles-ci ont évolué à partir d'une  $\alpha$ -protéobactérie endocytée par une cellule eucaryote ancestrale. Une telle hypothèse sur l'origine de la mitochondrie a été suggérée par la mise en évidence, en 1963 de l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui diffère de l'ADN nucléaire (Nass and Nass, 1963). On a longtemps pensé que les mitochondries étaient exclusivement d'hérédité maternelle, mais une étude récente semblerait pouvoir bouleverser ce concept en montrant que certaines mitochondries contiennent de l'ADNmt paternel (Luo et al., 2018). Néanmoins, la généralisation de cette transmission de mitochondries d'origine paternel reste un sujet très controversé (Rius et al., 2019) et d'autres études sur le sujet méritent d'être menées.

### 1.1.2. Structure

Bien qu'il ait été mis en évidence différentes formes de mitochondries (cylindriques, arrondies) (Palade, 1952), la structure caractéristique de base demeure la même. La mitochondrie est formée de deux membranes bien distinctes une membrane externe et une membrane interne formant de nombreuses invaginations ou crêtes (*Figure 6*). Ces membranes sont très différentes dans leur composition et délimitent un espace intermembranaire et un espace matriciel. La composition biochimique des différents compartiments mitochondriaux ainsi délimités reflète les fonctions qui y sont associées. La structure détaillée des mitochondries a déjà fait l'objet de nombreuses revues de littérature et ne sera donc pas un point central de ce manuscrit (Hom and Sheu, 2009). Pour résumé (*Figure 6*), on peut observer que la membrane externe mitochondriale est composée de 60% de protéines de 40% de lipides et est perméable aux petites molécules (< 10 kDa), en raison de la présence

d'un certain nombre de porines, tel que VDAC (Voltage Dependant Anion Channel). La membrane interne est quant à elle composée de 75% de protéines et de 25% de lipides et est complètement imperméable, même aux petites molécules (excepté l'O<sub>2</sub>, le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub>O). Elle est majoritairement composée des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. La matrice mitochondriale renferme l'ADNmt et les enzymes du cycle de Krebs. Ces quelques éléments caractéristiques des mitochondries sont aussi résumés dans la revue de littérature « Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury : A central role for mitochondria ? » publiée au cours de mon travail de thèse (Boulghobra et al., 2020a) et disponible dans le *Chap 2/IV* du manuscrit.



**Figure 6** : Principales caractéristiques des différents compartiments de la mitochondrie cardiaque.

Bien que les mitochondries possèdent leur propre ADN, une partie importante des protéines essentielles à leur bon fonctionnement sont codées par le génome nucléaire de la cellule « hôte ». Les mitochondries sont donc très bien adaptées structurellement et fonctionnellement à la physiologie de cette cellule hôte. La cellule cardiaque contient entre 7000 et 10000 mitochondries organisées sous la membrane plasmique (mitochondries subsarcolemmales, **SSM**), rangées entre les myofilaments (mitochondries intermyofibrillaires, **IFM**) ou encore autour du noyau (mitochondries perinucléaires, **PN**) avec une très forte densité en crêtes et une activité enzymatique très élevée. En plus de leur localisation particulière, ces sous-populations de mitochondries peuvent aussi se différencier par leurs morphologies et leurs propriétés biochimiques. Les SSM, sont plus variables en forme et en taille tandis que les IFM sont plutôt uniformes (majoritairement lamelliformes) et de même taille. Au vu de leur localisation, les IFM sont directement impliquées dans la contraction et possèdent des capacités de régulation métabolique et calcique supérieures aux SSM. De manière intéressante, la protéine membranaire connexine 43 (Cx43) également connue sous le nom de GJA1, est uniquement présente au niveau des SSM (Boengler et al., 2009). Ceci pourrait contribuer à expliquer les différences fonctionnelles qu'il existe entre IFM et SSM, car plusieurs études ont reporté que la Cx43 mitochondriale était capable de réguler la respiration mitochondriale, au niveau du complexe I de la chaîne de transfert des électrons (CTE) et ainsi de moduler la production d'ERO et la synthèse d'ATP (Denuc et al., 2016; Heinzl et al., 2005). Par ailleurs, il a également été démontré que les SSM de par leur localisation (sous-sarcolemmale) jouent un rôle clé dans la sensibilité d'une cellule à l'IR (García-Niño et al., 2017a; Kuznetsov and Margreiter, 2009a). En effet, cette sous population de mitochondries est exposée à des niveaux d'O<sub>2</sub> importants (Kuznetsov and Margreiter, 2009b) et est également plus sensible à la surcharge calcique et à l'inhibition de la phosphorylation oxydative que les IFM (García-Niño et al., 2017a; Holmuhamedov et al., 2012).

## 1.2. Mitochondrie et métabolisme énergétique cardiaque

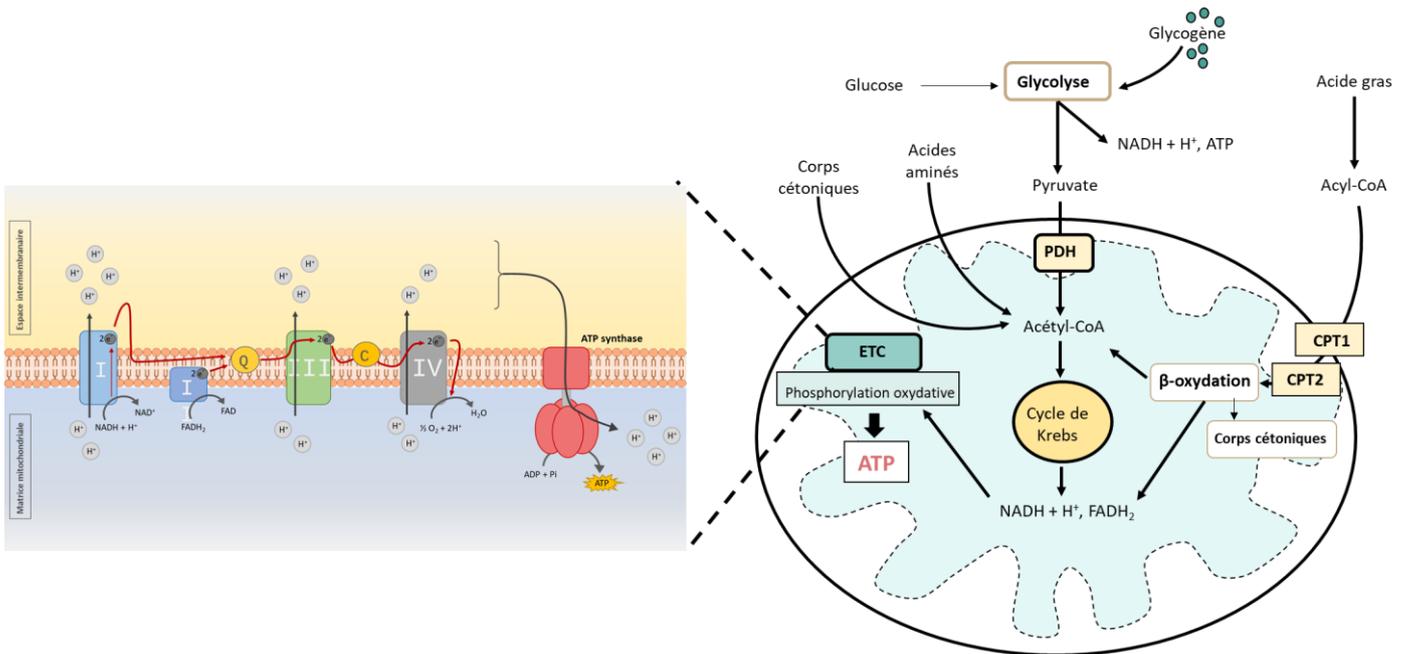
En normoxie, l'énergie nécessaire au bon fonctionnement du cœur provient majoritairement de quatre substrats énergétiques : des acides gras (60 à 90%), des glucides (glucose, 8 à 30% et lactate, 10%), des corps cétoniques (5 à 15%) et des acides aminés (< 5%). Dans le myocarde normal, les sources principales d'énergie proviennent de la  $\beta$ -oxydation des acides gras, du glucose et du lactate. Ce métabolisme conduit à une production d'ATP au prix d'une consommation d'O<sub>2</sub> variable selon le

substrat, la voie métabolique mis en jeu, la charge de travail cardiaque ainsi que le statut hormonal et la charge nutritionnelle. Quel que soit le substrat présent dans la circulation coronaire, dans chaque cas il existe des voies de dégradation pour transformer le substrat d'origine en acétyl-Coenzyme A (l'acétyl-CoA). En effet, l'acétyl-CoA produit dans le cytoplasme par la glycolyse et par la  $\beta$ -oxydation des acides gras dans la mitochondrie va entrer dans le cycle de Krebs. Chaque tour de cycle permet de produire à partir d'une molécule d'acétyl-CoA des coenzymes réduits (NADH et à moindre degré FADH<sub>2</sub>), donateurs d'électrons de haute énergie. Ce flux d'électrons est pris en charge par différentes réactions d'oxydo-réduction assurées par les quatre complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I à IV). Selon la théorie de Mitchell (Mitchell, 1966), l'énergie libre produit par la ré-oxydation des cofacteurs et convertie sous la forme d'un gradient de protons généré par le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I à IV) est utilisée par l'ATP synthase (complexe V) pour catalyser la réaction phosphorylante de l'ADP en ATP en présence de Phosphate inorganique (Pi).

Pour plus de détail, la chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 5 complexes protéiques et de deux transporteurs solubles le coenzyme Q (ubiquinone) faisant la navette entre les complexes I, II et III et le cyt c lié à la cardiolipine assurant le transport des électrons du complexe III à IV. Ces complexes passent d'un état réduit à oxydé grâce au transfert d'électrons d'un complexe à un autre. Les molécules de NADH (produites par la  $\beta$ -oxydation, et le cycle de Krebs) sont oxydées par le complexe I (ou NADH déshydrogénase) tandis que le complexe II (ou succinate déshydrogénase) oxyde le FADH<sub>2</sub> (produit par le cycle de Krebs et la  $\beta$ -oxydation). Les électrons provenant du complexe I et II sont transférés à l'ubiquinone (coenzyme Q), puis acheminés au complexe III (ou coenzyme Q cytochrome c réductase) et au complexe IV (ou cyt c oxydase), via le cyt c. La chaîne des oxydoréductions aboutit finalement à la réduction de l'O<sub>2</sub> moléculaire en eau par le complexe IV. Ces transferts successifs d'électrons s'accompagnent d'une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III, IV ce qui crée un gradient de concentration de protons (ou gradient de pH), et un  $\Delta\Psi_m$  à travers la membrane interne. Les protons ainsi expulsés de la matrice vont, du fait d'un gradient électrochimique favorable, retourner dans la matrice en empruntant le « canal » d'une protéine particulière appelée F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ATP synthase (ou complexe V). Le flux de protons va alors activer l'ATP synthase et permettre la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi (Figure 7). Le maintien de ce gradient électrochimique, encore appelé force protomotrice est donc un élément indispensable au rôle énergétique de la mitochondrie. Mais au-delà de ces considérations, il conditionne l'homéostasie cellulaire toute entière en influençant la composition chimique de la

matrice et du cytosol, en régulant la production d'ERO et en participant à la régulation de la mort cellulaire par l'intermédiaire de son action sur la transition de perméabilité mitochondriale (Lemasters et al., 1999).

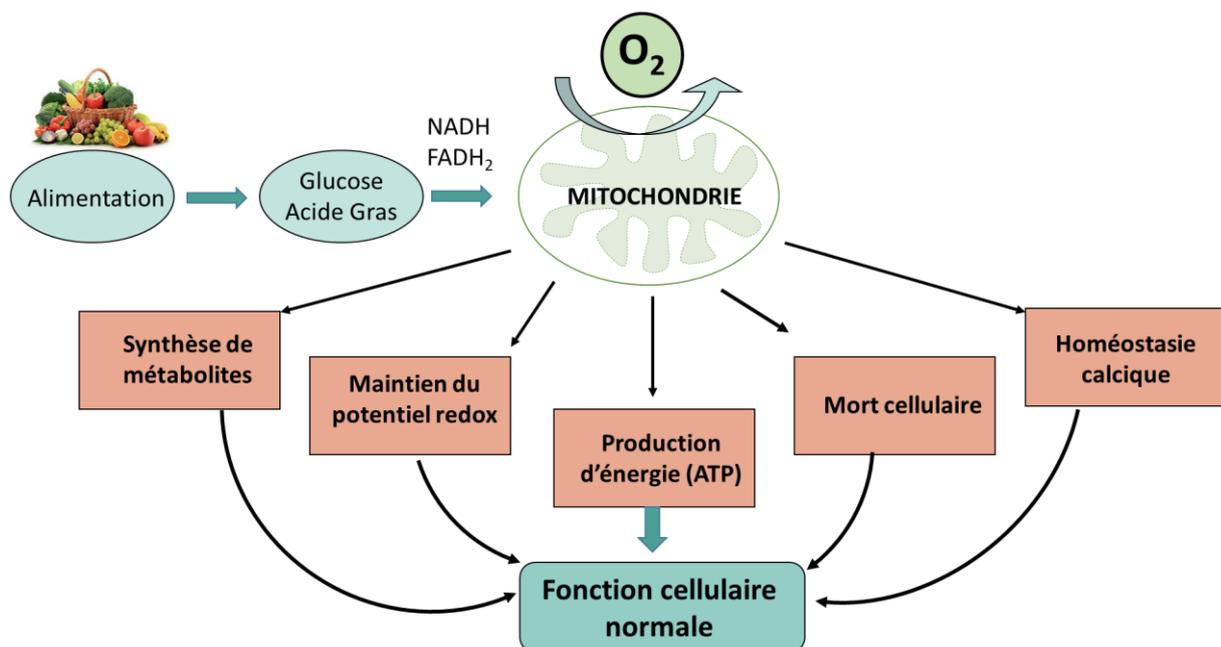
Plusieurs facteurs permettent de réguler la respiration mitochondriale en modulant la production des coenzymes réduits (NADH et  $\text{FADH}_2$ ), dont notamment : la disponibilité des substrats de l'OXPHOS (ADP et  $\text{P}_i$ ), l'activité des déshydrogénases régulée par la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  matriciel (Tarasov et al ; Cell calcium,2012) (pour plus de détails voir Chap1/II/2.1.1) et aussi de manière intéressante dans le le contexte de nos travaux, la voie du NO. En effet, le NO a été démontré comme inhibant la respiration mitochondriale, notamment en rentrant en compétition avec l' $\text{O}_2$  au niveau du complexe IV (pour plus de détails voir Chap2/II/2/2.2).



**Figure 7:** Respiration mitochondriale.

### 1.3. La mitochondrie au centre de l'homéostasie cellulaire

Les mitochondries, qui ont longtemps été considérées uniquement comme les poumons de la cellule, sont aujourd'hui reconnues comme jouant de nombreux rôles afin d'assurer un fonctionnement cellulaire cohérent. Ainsi, en plus de leur rôle central dans l'énergétique cellulaire, elles participent à de nombreux processus dont notamment la régulation du pH (Wei et al., 2011), la synthèse d'hormones stéroïdes, la thermogénèse (Cannon and Nedergaard, 2008), l'homéostasie du glucose, la sécrétion d'insuline (Jitrapakdee et al., 2010), l'homéostasie ionique et la production d'ERO (Starkov, 2008) (Figure 8). Considérant le rôle clé de l'interaction entre homéostasie calcique et production d'ERO dans les désordres fonctionnels de la mitochondrie au cours de l'IR, ces deux points seront particulièrement développés dans la suite du manuscrit.



**Figure 8** : La mitochondrie au centre de l'homéostasie cellulaire.

## 2. Altérations mitochondriales liées à l'ischémie-reperfusion

Il est maintenant bien admis que les mitochondries occupent une place centrale dans les lésions cardiaques observées au cours de l'IR (Kuznetsov et al., 2019; Yellon and Hausenloy, 2007). La surcharge calcique de la matrice mitochondriale, la production massive d'ERO et l'activation du mPTP semblent être les principales modifications identifiées au cours des lésions d'IR. Afin de mieux comprendre le rôle de la mitochondrie dans les altérations liées à l'IR, nous détaillerons dans un premier temps sa place dans l'homéostasie calcique puis dans la signalisation redox, deux éléments essentiels au bon fonctionnement mitochondrial et cellulaire.

### 2.1. Altération de l'homéostasie calcique au cours de l'IR

#### 2.1.1. Homéostasie calcique mitochondriale

Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du CEC (Bers, 2002). En effet, la concentration calcique cytoplasmique des cardiomyocytes au repos est basse (environ 100 nM). Lors d'un potentiel d'action (PA), la dépolarisation membranaire active les canaux calciques de type L, ou les récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) pour faire rentrer du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Celui-ci sert à ouvrir le canal calcique du RS appelé le RyR, ce qui favorise la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS dans le cytosol via un mécanisme appelé «  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release » (CICR). Cette augmentation transitoire de la concentration cytosolique de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_c = 1-3 \mu\text{M}$ ), appelée transitoire calcique, déclenche une contraction cardiaque via la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la troponine C présente au niveau de la machinerie contractile. La relaxation se produit lorsque celui-ci se détache des troponines. Il est alors recapté par le RS via SERCA (sarco/reticulum endoplasmique  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase) et/ou extrudé de la cellule par les échangeurs NCX. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est ainsi ramené à sa valeur de repos (environ 100 nM) (Figure 9).

Bien que le rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique ait longtemps été négligé, il est aujourd'hui bien établi que celle-ci est capable de capter une quantité importante de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du CEC, en réponse au transitoire calcique (Bassani et al., 1993; Negretti et al., 1993). En effet, l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  localisé au niveau de la mitochondrie a permis de montrer que le  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial oscille de façon synchrone au  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et qu'il répond

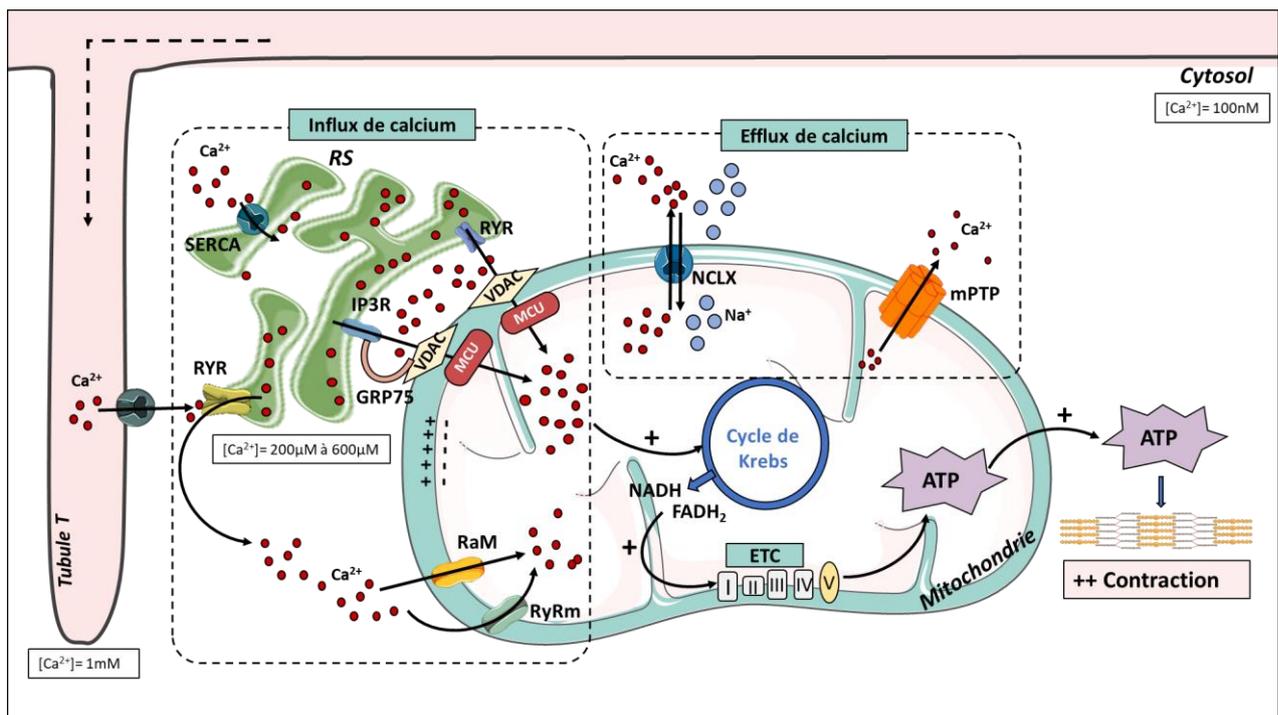
aux sollicitations inotropes et chronotropes telles que l'exposition à l'adrénaline ou l'acétylcholine (Robert et al., 2001). Outre sa participation au CEC, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie joue un rôle énergétique par l'activation des déshydrogénases sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  (pyruvate, isocitrate, oxoglutarate déshydrogénases) gouvernant la disponibilité des équivalents réduits (NADH et  $\text{FADH}_2$ ) et donc la synthèse d'ATP (Glancy and Balaban, 2012; McCormack et al., 1990; Tarasov et al., 2012). La mitochondrie peut donc réguler de façon fine l'homéostasie calcique cellulaire.

Cependant, il a été démontré que l'affinité du MCU (Mitochondrial Calcium Uniporteur, principale porte d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie) pour le  $\text{Ca}^{2+}$  est faible ( $K_d = 10 \mu\text{M}$ ). Ainsi, la concentration cytosolique au repos ( $[\text{Ca}^{2+}]_c = 100 \text{ nM}$ ) n'est pas suffisante pour permettre une absorption mitochondriale efficace (De Stefani et al., 2016). En conséquence, des concentrations importantes et localisées de  $\text{Ca}^{2+}$  sont nécessaires afin de permettre l'activation du MCU. Pour cela, l'existence de microdomaines à l'interface entre RS (réserve principale de  $\text{Ca}^{2+}$ ) et mitochondries a été mise en évidence et permet d'expliquer en partie ce phénomène (De la Fuente and Sheu, 2019; Rizzuto et al., 2000). En effet, des récentes études utilisant des techniques de tomographie électronique ont révélé la présence de zones de contacts entre les protéines du RS et la mitochondrie (Rizzuto et al., 2004), permettant la transmission rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS au réseau mitochondrial sans impacter la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique. L'association du RS avec les mitochondries a été décrite pour la première fois par Copeland et Dalton (Copeland and Dalton, 1959). Depuis, ces zones de contacts entre mitochondries et RS ont été observées par plusieurs autres groupes de recherche (Morré et al., 1971; Rizzuto et al., 1998). On parle de « mitochondria-associated membranes » (MAM). Ces MAM sont composés du récepteur de l'inositol 1, 4, 5 triphosphate de type 1 ( $\text{IP}_3\text{R}_1$ ), principal canal de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  présent sur le RS et de  $\text{VDAC1}$  présent au niveau de la membrane externe mitochondriale et qui permet l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie. On retrouve également, la protéine de stress mitochondrial  $\text{GRP75}$  (ou  $\text{mtHSP70}$ ) qui relie les deux canaux à travers leurs portions cytosoliques (Szabadkai et al., 2006). De cette manière, ce complexe dont la stabilité peut être modulée dynamiquement par différents stimuli (tel que  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (De Stefani et al., 2012), favorise le transfert du  $\text{Ca}^{2+}$  de la lumière du RS vers la mitochondrie (Giacomello and Pellegrini, 2016). Le  $\text{RyR}$  serait également présent au niveau des MAM, où il jouerait un rôle crucial dans les cellules excitables (Eisner et al., 2013). En effet, dans le cœur, l'isoforme  $\text{RyR2}$  est reporté comme étant le principal médiateur de la relation entre RS-mitochondrie (Eisner et al., 2013). En plus du  $\text{GRP75}$ , qui relie les canaux du RS et de la mitochondrie, les mitofusines ( $\text{Mfn 1}$  et  $\text{Mfn 2}$ , protéines de fusion mitochondriale) ont également été proposées pour stabiliser le complexe RS-mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008; Chen et al., 2012). Ainsi,

dans des conditions physiologiques normales, la communication RS-mitochondrie semble cruciale pour le système cardiovasculaire. Malgré la proximité physique des mitochondries avec le RS et la dépendance des mitochondries au  $\text{Ca}^{2+}$  dans la production d'ATP, la capacité des mitochondries à tamponner de manière dynamique le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est encore débattue (Boyman et al., 2014).

Plusieurs canaux et transporteurs ont été proposés comme régulant l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie (Dedkova and Blatter, 2013). Comme abordé ci-dessus le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'espace intra-membranaire vers la matrice mitochondriale est principalement contrôlé par le MCU (Pan et al., 2013), un complexe protéique situé au niveau de l'IMM et connu comme étant dépendant du  $\Delta\Psi_m$  (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011). Celui-ci se compose de la sous-unité MCU (450 kDa), qui s'oligomérisse en tétramère pour former un canal fonctionnel (Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011), de MICU 1 (Mitochondria calcium uptake 1) et MICU 2, (Mitochondria calcium uptake 2) des protéines régulatrices qui contiennent toutes les deux des domaines « main-EF » faisant face à l'espace inter membranaire et capables de détecter le  $\text{Ca}^{2+}$  et ainsi de contrôler l'ouverture du MCU. En effet, MICU 1 est considéré comme le « portier » du MCU. A de faibles concentrations extra-mitochondriales de  $\text{Ca}^{2+}$ , MICU 1 maintient le MCU dans un état fermé, inhibant l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$ , alors qu'en présence de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ , le domaine « main-EF » de MICU 1 se lie au  $\text{Ca}^{2+}$  conduisant à un changement conformationnel de MICU 1 et à l'ouverture du canal (Csordás et al., 2013; Mallilankaraman et al., 2012). EMRE (Essential MCU Regulator) est le dernier composant du canal à avoir été identifié. C'est une protéine de 10 kDa, présente dans la membrane interne mitochondriale (IMM) et qui est essentielle à l'activité du MCU, comme le démontre des expériences menées sur des cellules déficientes pour EMRE et pour lesquelles l'absorption mitochondriale de  $\text{Ca}^{2+}$  est abolie. En effet, celui-ci permet l'assemblage des sous-unités régulatrices MICU 1 et MICU 2 à la membrane (Sancak et al., 2013). Le  $\text{Ca}^{2+}$  peut également entrer dans la mitochondrie par un mécanisme rapide appelé RaM (Rapid Uptake Mode) (Buntinas et al., 2001), dont la structure est encore inconnue à ce jour. Son activité est supérieure à celle du MCU pour de faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  et diminue avec l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial (Santo-Domingo and Demareux, 2010). L'existence d'un RyR mitochondrial a également été suggérée (Ryu et al., 2010), mais reste controversée. Le RyR tout comme le RaM permettrait une séquestration rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  à de faibles concentrations. Celui-ci est inhibé à de fortes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$ , suggérant son rôle physiologique dans l'homéostasie calcique (Ryu et al., 2010). La sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules du muscle cardiaque est principalement médiée par l'échangeur mitochondrial NCX, dont l'identité n'a été identifiée que récemment (Boyman et al., 2013; Palty et al., 2010).

Alors que l'entrée de petites quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  peut avoir des effets bénéfiques sur l'homéostasie métabolique, un nombre considérable d'études démontre que l'absorption d'une grande quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  est responsable de dysfonctionnements de la mitochondrie et finalement de la mort des cellules (Rasola and Bernardi, 2011; Rizzuto et al., 2012). Il est bien décrit que l'homéostasie calcique est fortement perturbée en cas d'IR myocardique, dans ce cas les mitochondries deviennent capables de stocker d'importantes quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  (Griffiths and Rutter, 2009). Cependant, quand la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  atteint un certain seuil, on parle de « set point » (1 à 3  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique) (Nicholls, 1978), l'échange calcique de part et d'autre de la membrane devient insuffisant et conduit à une surcharge calcique qui peut être préjudiciable pour la cellule (voir Chap1/II/ 2.1.2 : conséquences de l'IR).



**Figure 9** : La mitochondrie au centre de l'homéostasie calcique.

### 2.1.2. Conséquences de l'ischémie-reperfusion

Comme décrit précédemment, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule se fait majoritairement par l'ouverture du MCU, qui utilise l'énergie du  $\Delta\Psi_m$  pour absorber ce dernier. Dans ce cas l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries agira en dissipant le  $\Delta\Psi_m$  à moins que le transport d'électrons ne soit fortement activé afin de restaurer ou maintenir le gradient électrochimique. Ainsi, pendant l'ischémie, alors que le transport d'électrons est diminué, on s'attend à ce que l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  par les mitochondries dissipe le  $\Delta\Psi_m$  limitant finalement l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries. Néanmoins, la plupart des études reportent une légère augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale (Griffiths et al., 1998 ; cardiovas Res). Afin d'expliquer ce phénomène, Griffiths et al. ont démontré en 1998 que l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  matriciel au cours de l'ischémie pouvait être inhibé par le clonazépam, un inhibiteur du NCX mitochondrial, une autre porte d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie au cours de l'IR, suggérant que le NCX fonctionne en mode inversé au cours de l'ischémie et contribue à augmenter le  $\text{Ca}^{2+}$  matriciel (Griffiths et al., 1998). En accord avec ces résultats, certains auteurs rapportent une augmentation de la quantité d'ARNm du NCX au cours de l'ischémie (Luongo et al., 2017). Pendant la reperfusion, l'apport brutal d' $\text{O}_2$ , le rétablissement du  $\Delta\Psi_m$  et la restauration du pH conduisent à une exacerbation de la surcharge calcique mitochondriale. Griffiths et al. en 1998 démontrent que l'utilisation de clonazépam, exacerbe la surcharge calcique au cours de la reperfusion, suggérant le rôle du NCX dans l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la reperfusion (Griffiths et al., 1998). Il est intéressant de noter, que l'utilisation d'agents cardioprotecteurs tels que le diazotide et les inhibiteurs du NCX sarcolemmales réduisent la surcharge calcique au cours de la reperfusion post-ischémique (Murata et al., 2001).

Par ailleurs, la reprise de la chaîne respiratoire mitochondriale conduit à un rétablissement du  $\Delta\Psi_m$  ce qui conduit à la réactivation du MCU (Joiner et al., 2012) et permet ainsi d'expliquer l'origine de la surcharge calcique mitochondriale au cours de la reperfusion (Oropeza-Almazán et al., 2017). En effet, des études rapportent que la reperfusion est associée à une augmentation de l'expression du MCU (Guan et al., 2019). En accord avec ce phénomène, Luongo et al., ont pu démontrer en 2015 (Luongo et al., 2015) que la délétion du MCU (souris  $\text{MCU}^{-/-}$ ) limite les lésions d'IR en empêchant la surcharge calcique mitochondriale au cours de la reperfusion. Une récente étude menée par Oropeza-Almazán et al. en 2017 confirme ces résultats puisque les auteurs démontrent que la baisse de l'expression du MCU par un siARN semble protéger les mitochondries des lésions d'IR (Oropeza-Almazán et al., 2017). Cette surcharge calcique est associée à une altération de fonction cardiaque au

cours de l'IR. En effet, Miyamae et al. (1991) démontrent par la mesure du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial, via l'utilisation d'une sonde fluorescente sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  (iodo-1) que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitochondriale au cours de l'ischémie est négativement corrélée à la récupération fonctionnelle des cœurs au cours de la reperfusion post-ischémique (Miyamae et al., 1996). L'utilisation de rouge de ruthénium (Ru360), un inhibiteur du MCU atténue la  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitochondriale et améliore la récupération fonctionnelle à la reperfusion (Miyamae et al., 1996). L'activation du MCU au cours de la reperfusion s'explique en partie par l'altération de MICU 1, une protéine essentielle à la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial. En effet, Mallilankaraman et al. (2012) démontre qu'en l'absence de MICU 1, les mitochondries deviennent constitutivement chargées en  $\text{Ca}^{2+}$ , et ainsi plus sensible au stress apoptotique (Mallilankaraman et al., 2012). Une récente étude, confirme ce résultat puisque les auteurs démontrent sur un modèle d'IR, une diminution de MICU 1 au niveau mitochondrial, sans modification de son niveau total (Xue et al., 2017). Les auteurs expliquent cette diminution par l'altération de l'expression de TOM70 (Mitochondrial import receptor subunit), une protéine connue comme pouvant réguler la localisation mitochondriale de MICU 1 (Xue et al., 2017).

Lors de la reperfusion, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique et mitochondrial conduit à l'activation des calpaines, des protéases à cystéines connues pour participer aux lésions d'IR (Inserte et al., 2012; Zheng et al., 2020). L'activation des calpaines entraîne une altération de la dynamique mitochondriale qui s'explique par une augmentation de la fission des mitochondries au cours de l'IR (Gao et al., 2016; Manechote et al., 2018). En effet, les calpaines vont activer la calcineurine, elle-même capable de phosphoryler Drp1, une GTPase régulatrice de la fission mitochondriale. Ceci est associé à une diminution de l'expression d'OPA1 (Optic Atrophy type 1), une protéine impliquée dans la fusion des mitochondries. Considérant le rôle que pourrait jouer MCU au cours de l'IR, Guan et son équipe, ont récemment démontré par l'utilisation de modèles *in vivo* et *in vitro* d'IR, que l'activation des calpaines suite à la surcharge calcique induite par l'ouverture du MCU, inhibe la fusion mitochondriale et favorise la fission des mitochondries, via une augmentation de l'expression de Drp1 (Guan et al., 2019). Tout ceci participe à expliquer les altérations mitochondriales liées à l'IR et met en lumière le rôle du MCU dans la surcharge calcique au cours de l'IR. Ainsi toutes les stratégies visant à inhiber l'ouverture du MCU au cours de la reperfusion semblent prometteuses.

Enfin, plusieurs études se sont intéressées au rôle de la communication RS-mitochondrie dans la surcharge calcique au cours de l'IR (Zhou et al., 2018). Il est aujourd'hui bien connu que la Cyp D, régulateur clé du mPTP est capable d'interagir avec le complexe VDAC1/GRP75/IP3R1 des MAM afin

de réguler le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS aux mitochondries dans les cardiomyocytes (Paillard et al., 2013). Au cours de l'IR, l'interaction entre la Cyp D et MAM est augmentée, ce qui permet d'expliquer la surcharge calcique au cours de la reperfusion. L'inhibition de l'expression d'un des composants du complexe (VDAC1, GRP75 ou IP3R1), atténue la surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  des mitochondries et protège ainsi les cardiomyocytes des effets néfastes de l'hypoxie/réoxygénation. De manière intéressante, l'inhibition génétique ou pharmacologique de la Cyp D fournit des résultats similaires, confirmant le rôle de la Cyp D dans la surcharge calcique.

## 2.2. Modification d'EROs mitochondriales au cours de l'ischémie-Reperfusion

### 2.2.1. Mitochondrie et production d'ERO

Comme largement décrit dans la littérature scientifique, en plus de jouer un rôle dans la production d'énergie et l'homéostasie calcique, les mitochondries représentent une des sources majeures de production d'ERO dans le cœur et sont des cibles importantes des dommages oxydatifs (Chen and Zweier, 2014; Murphy, 2009; Zorov et al., 2014). Les ERO sont des espèces chimiques qui se forment suite à la réduction partielle de l' $\text{O}_2$ . Les scientifiques ont longtemps pensé que les ERO jouaient uniquement un rôle délétère pour la cellule en réagissant sans discernement avec les lipides, les protéines et l'ADN (Cross et al., 1987). Cependant, au cours des deux dernières décennies, le rôle des ERO en tant que médiateurs de la signalisation intracellulaire a bien évolué et est aujourd'hui bien accepté. On parle alors de signalisation redox (Schieber and Chandel, 2014; Sena and Chandel, 2012). Des exemples de ces processus cellulaires comprennent la signalisation des facteurs de croissance, la transduction du signal hypoxique, l'autophagie, la réponse immunitaire et la prolifération et différenciation des cellules souches. De faibles productions d'ERO ont aussi été rapportées comme faisant partie des voies de cardioprotection (Chen et al., 1995) (*pour plus de détails voir Chap 2/I*). En effet, il a été démontré que l'utilisation de diazoxide, un activateur du canal mitoKATP (Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel) augmente la production d'ERO (Forbes et al., 2001; Pain et al., 2000) et que l'utilisation d'antioxydants abolit la protection offerte par le diazoxide. Ainsi, de faibles niveaux d'ERO sont essentiels au bon fonctionnement des mitochondries et à la signalisation de la cardioprotection. Une production modérée d'ERO au cours du pré-conditionnement ischémique, a

également était démontré comme étant protecteur, en inhibant de manière réversible certains complexes de la CTE (Vanden Hoek et al., 1998).

Le transport d'électrons dans le fonctionnement mitochondrial constitue une des principales sources d'ERO dans la cellule. En effet, jusqu'à 0,2-2% de l'O<sub>2</sub> moléculaire consommé par les mitochondries pendant la respiration est converti en superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) suite à une fuite d'électrons produit majoritairement au niveau des complexes I et III de la chaîne de transport des électrons. L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> généré par la CTE mitochondriale est ensuite libéré dans la matrice où il est rapidement dismuté en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la superoxyde dismutase 2 (SOD2) (Murphy, 2009). L'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> généré par le complexe III est également libéré dans l'espace inter-membranaire où il peut traverser des canaux anioniques et être converti en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la SOD 1 (Muller et al., 2004). Il existe une corrélation entre le  $\Delta\Psi_m$  et la production d'ERO par le transport d'électrons. Ainsi, grâce à un système antioxydant efficace, la production d'ERO est limitée aux sites subcellulaires et participent de manière active à la signalisation redox, importante dans la physiologie des cardiomyocytes (Cadenas, 2018; Santos et al., 2016). Il a en effet été démontré que la régulation de la production d'ERO était impliquée dans la fonction contractile des cardiomyocytes. En effet, Prosser et al. (2011) ont démontré que l'étirement du cardiomyocyte active la production transitoire d'EROs via l'activation de la NADPH oxydase 2 (NOX 2), localisée au niveau de la membrane, ce qui stimule la signalisation calcique et la contraction cardiaque (Prosser et al., 2011). A l'inverse, une surproduction d'ERO conduit à une altération de la contractilité cardiaque (Canton et al., 2006). En effet, dans certaines conditions, un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire peut entraîner une forte augmentation de la production d'ERO et ainsi produire un stress oxydant (Andreadou et al., 2020). A ce moment-là, les ERO en synergie avec le Ca<sup>2+</sup> induisent une réponse au stress cellulaire et activent l'apoptose en augmentant la transition de perméabilité de la membrane mitochondriale et/ou en modulant les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille des Bcl2 (Youle and Narendra, 2011). C'est ce mécanisme qui se met en place dans le cadre de l'IR.

### 2.2.2. Conséquences de l'Ischémie-reperfusion

Au cours de la phase d'ischémie, l'O<sub>2</sub> se raréfie. L'idée d'une production accrue d'ERO lors de l'ischémie peut donc paraître contre intuitive, elle a toutefois été mise en évidence dans plusieurs études (Becker, 2004). En effet, au cours de l'ischémie, le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire est fortement ralenti ce qui accroît l'accumulation à l'état réduit des transporteurs

d'électrons favorisant la formation d' $O_2^{\bullet}$ , tant que l' $O_2$  est disponible. Cette augmentation de stress oxydant au cours de l'ischémie s'explique également par une diminution des enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase et SOD) et conduit à l'altération du fonctionnement de tous les complexes de la chaîne de transport des électrons (Jennings and Ganote, 1976). En effet, les premiers dommages liés à l'ischémie sont observés au niveau du complexe I (Paradies et al., 2004). L'oxydation de la cardiolipine, phospholipide nécessaire au transfert d'électrons, semble jouer un rôle important dans les dommages ischémiques du complexe I. En effet, l'ischémie diminue le contenu en cardiolipine dans la IMM par peroxydation de leurs chaînes riches en acide gras par les ERO (Paradies et al., 2004). Plus l'ischémie se poursuit plus les complexes en aval sont touchés (Chen and Zweier, 2014). En effet, au-delà de 45 minutes, les dommages ischémiques progressent pour atteindre le complexe III et le complexe IV (Veitch et al., 1992). Tout comme le complexe I, l'oxydation de la cardiolipine joue un rôle majeur dans l'atteinte du complexe III (Petrosillo et al., 2003). Le complexe IV ne semble quant à lui pas touché par l'ischémie (Lesnefsky et al., 1997). Les dommages ischémiques de la cardiolipine sont spécifiques puisque les autres phospholipides sont préservés pendant l'ischémie. Concernant le complexe V (ou ATP synthase), il a été montré que pendant l'ischémie, l'activité de l'ATP synthase passe de la synthèse à l'hydrolyse de l'ATP. Par conséquent le contenu en ATP diminue. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation de l'oligomycine (un inhibiteur du complexe V), prévient la perte d'ATP au cours de l'ischémie (Grover et al., 2004). Ainsi, durant l'ischémie, la chaîne respiratoire mitochondriale est bien altérée et la production d'ATP diminue ce qui perturbe le fonctionnement mitochondrial.

Bien que la production des ERO au cours de l'ischémie altère un certain nombre de protéines clés, celle-ci semble être fatale uniquement au cours de la reperfusion post-ischémique (Morin et al., 2009). En effet, lors de cette reperfusion, la reprise brutale de la chaîne respiratoire mitochondriale (endommagée au cours de l'ischémie) va être à l'origine d'une production massive d'ERO (Chen et al., 2007). Comme décrit précédemment, la grande majorité des ERO produits à la reperfusion provient des complexes I et III de la CTE (Lee et al., 2012a). De plus, l'altération des composés de la chaîne respiratoire par l'acidose ischémique et par les ERO lors de la reperfusion renforce le dysfonctionnement mitochondrial, exacerbant ainsi la production d'ERO (Zorov et al., 2014) tout comme l'utilisation par le complexe II du succinate accumulé pendant l'ischémie qui entraîne la production d' $O_2^{\bullet}$  (Andrienko et al., 2009). Cette production massive d' $O_2^{\bullet}$ , intervient alors que les défenses antioxydantes ont été affaiblies par l'ischémie. L' $O_2^{\bullet}$ , va alors initier un certain nombre de réactions chimiques aboutissant à la formation d'espèces réactives très cytotoxiques telles que le

peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) ou le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>). Ainsi, il semble aujourd'hui bien établi que ces ERO jouent un rôle significatif dans les lésions tissulaires observées au cours de l'IR, mais que ces lésions peuvent être atténuées par l'utilisation de piègeurs aux radicaux libres (Jolly et al., 1984). Ces espèces vont être capables de diffuser dans la cellule et ainsi contribuer à renforcer la dysfonction cellulaire globale.

En plus des complexes de la chaîne respiratoire, il apparaît également que les NADPH oxydases représentent d'importantes sources d'oxydants au cours de l'IR (Cave et al., 2006). En effet, une diminution de la dysfonction ventriculaire, du remodelage cardiaque, de la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, de la peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs de l'ADN au cours de l'IR ont été rapportés chez des souris déficientes pour NOX 2 (Chen et al., 2009; Zhao et al., 2009). NOX 4 est également connu pour participer aux lésions au cours de l'IR. De manière intéressante, NOX 4 semble être localisée au niveau de la mitochondrie ainsi qu'au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) (Block et al., 2009). Des travaux récents indiquent que la surexpression de NOX 4 spécifiquement dans l'endothélium exacerbe la taille de l'infarctus induit par un accident vasculaire cérébral (Griendling et al., 2000).

Ainsi l'interaction entre les différentes sources d'ERO semble jouer un rôle important dans les lésions d'IR. En effet, la production d'ERO dépendante des NOX peut déclencher une dysfonction mitochondriale qui à son tour conduit à l'exacerbation de la production d'ERO. L'inverse est également valable, la production d'ERO mitochondriale peut activer les NOX (Dikalov, 2011), eux mêmes responsables d'une généralisation de la dysfonction mitochondriale.

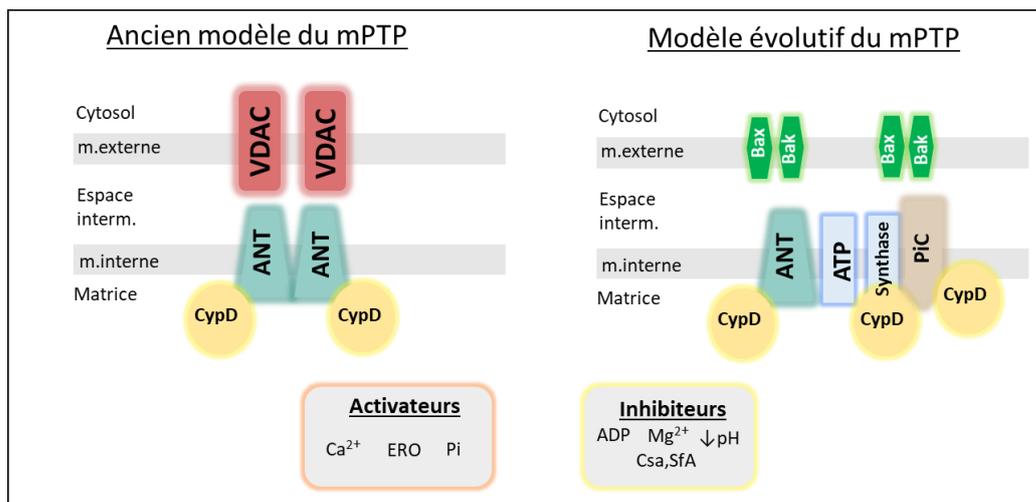
## 2.3. Interaction ERO-Ca<sup>2+</sup> au cours de l'Ischémie-reperfusion : activation du mPTP

### 2.3.1. Identité moléculaire du mPTP et son rôle en physiologie

On sait aujourd'hui, que la perméabilisation des membranes mitochondriales par l'ouverture du mPTP est un processus clé dans l'apparition des lésions de reperfusion. C'est l'un des évènements terminaux conduisant à la mort cellulaire. La surcharge calcique, le stress oxydant, les fortes concentrations de Pi et la déplétion en nucléotides adényliques sont des inducteurs essentiels de l'ouverture du mPTP au cours de la reperfusion post-ischémique. Bien qu'il soit aujourd'hui bien établi que le mPTP joue un rôle clé dans les lésions d'IR, sa caractérisation et son rôle en condition

physiologique dans la fonction cardiaque et le métabolisme demeurent aujourd'hui incertains et soumis à de nombreux débats. Il semble donc important de décrire son rôle physiologique afin de pouvoir ensuite mieux comprendre son implication dans la physiopathologie des lésions d'IR.

Le mPTP est un complexe multi protéique capable de former un pore non sélectif au niveau des zones de contact des membranes interne et externe mitochondriales (Crompton, 1999). L'identité moléculaire du mPTP n'étant pas clairement défini, de nombreux modèles ont à ce jour été proposés. En effet, Javadov et Karmazyn en 2007 ont tout d'abord considéré que le mPTP était composé de l'adénine nucleotide translocator (ANT) présent au niveau de la IMM et que son ouverture était régulée par la Cyp D ou Peptidyl-prolyl cis trans isomérase F (Ppif) (Crompton, 1999). L'ANT serait lui-même associé à VDAC localisé dans la membrane externe mitochondriale pour former le canal transmembranaire. Dernièrement, un nouveau modèle suggère que le mPTP serait un dimère d'ATP synthase et que la Cyp D régulerait son ouverture (Bernardi and Di Lisa, 2015; Giorgio et al., 2013) (Figure 10).



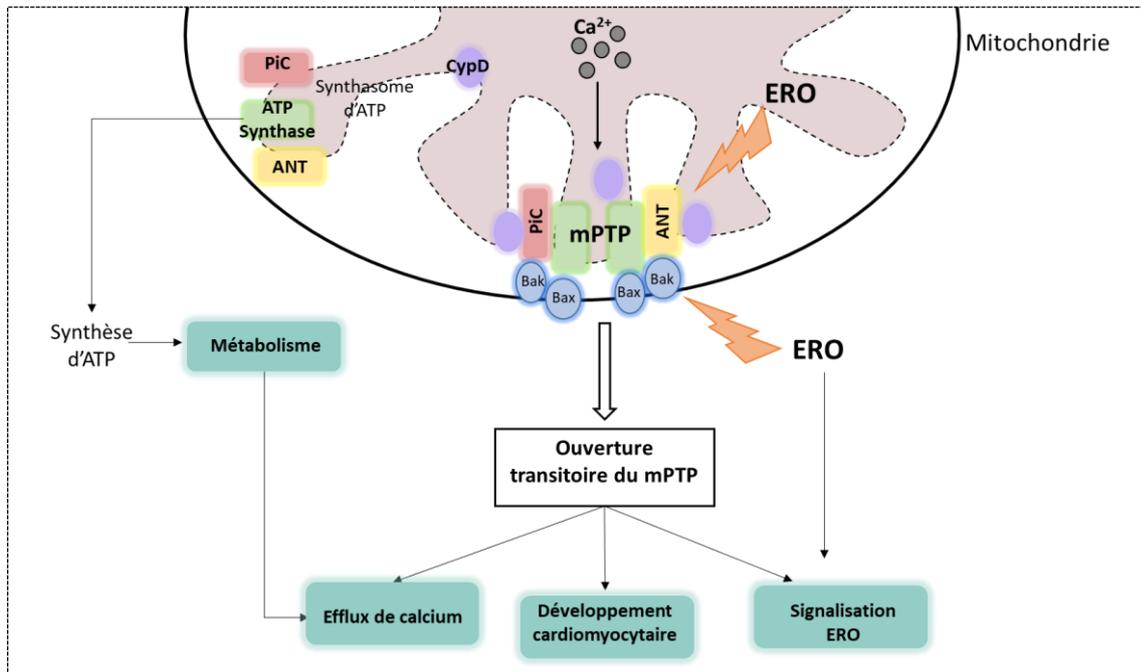
**Figure 10** : Structure du mPTP (Adaptée de Kwong et Molkenin, 2014).

En condition physiologique, l'ouverture transitoire du mPTP semble essentielle pour le métabolisme cardiaque (Figure 11) (Giorgio et al., 2013; Mnatsakanyan et al., 2017). En effet, l'ATP synthase, l'ANT et le  $Pi$  ne sont pas seulement fonctionnellement couplés pour la production d'ATP

mais sont également couplés physiquement au niveau de la membrane interne dans un super complexe appelé le synthasome d'ATP (Ko et al., 2003). La perte d'un des composés du synthasome entraîne une altération de l'OXPPOS (Bakker et al., 1993) et de la production d'énergie (Kwong et al., 2014). De plus, des études protéomiques sur des souris déficientes pour la Cyp D, ont rapporté des altérations des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et dans le métabolisme du pyruvate (Menazza et al., 2013). Tout ceci suggère qu'une désensibilisation du mPTP produit une reprogrammation globale du métabolisme cellulaire et que celui-ci représente un élément clé de la vie et de la mort cellulaire programmée en intégrant le métabolisme énergétique.

Comme décrit ci-dessus, l'homéostasie calcique joue un rôle clé dans le fonctionnement des mitochondries (*voir partie Chap1/II/2.1 –homéostasie calcique mitochondriale*) (Figure 9 et 11). Certaines études suggèrent que l'ouverture transitoire du mPTP permettrait de réguler le  $\text{Ca}^{2+}$  matriciel en modulant la concentration calcique intracellulaire (Korge et al., 2011). Un travail mené sur des souris déficientes pour la Cyp D conforte cette hypothèse (Elrod et al., 2010). Néanmoins, il semblerait que ceci ne soit valable qu'en condition pathologique puisque, d'autres études *ex vivo*, menées cette fois ci sur des cellules Hela, suggèrent que le mPTP ne jouerait finalement pas de rôle dans l'efflux du  $\text{Ca}^{2+}$  matriciel en condition physiologique (De Marchi et al., 2014). Ainsi, les études sur le sujet demeurent controversées et des études plus approfondies sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle physiologique du mPTP.

Le mPTP est aussi connu comme ayant une forte interaction avec la production d'ERO (Zorov et al., 2000) (Figure 11). Comme décrit précédemment, bien qu'une production excessive d'ERO puisse contribuer à accélérer la mort cellulaire via l'activation du mPTP, il a été démontré via l'utilisation d'indicateurs génétiques fluorescents sensibles à la production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  (cpYFP), qu'en condition physiologique (repos ou contraction cardiaque) les mitochondries sont capables d'émettre des « flashes » d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ , appelés « mitoflashes » (Li et al., 2012; Wang et al., 2008). Ces flashes sont discutés par les auteurs comme permettant de réguler la production d'ATP dans le cœur (Wang et al., 2017) et semblent être le résultat d'un couplage fonctionnel entre l'ouverture du mPTP et la production d'ERO par la CTE (Wang et al., 2008). En effet, l'apparition de ces « flashes » s'accompagne toujours d'une dépolarisation transitoire du  $\Delta\Psi_m$  (Wang et al., 2008). De plus, d'autres études ont pu démontrer que l'ouverture du mPTP coïncidait avec l'apparition de ces « flashes » (Wang et al., 2008). Ces mitoflashes semblent également participer au stress oxydatif au cours de la reperfusion (Huang et al., 2011; Wang et al., 2008).



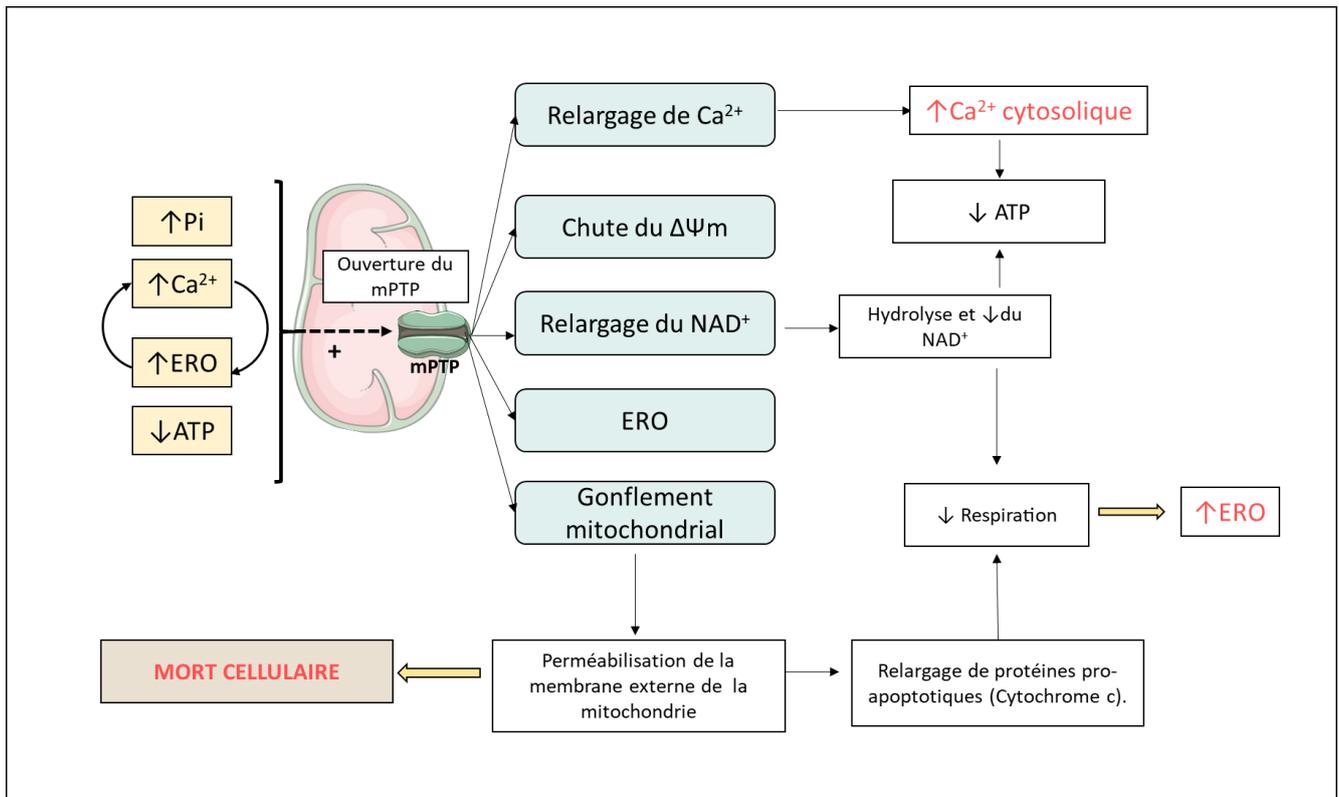
**Figure 11** : Rôles physiologiques du mPTP dans le cœur.

### 2.3.2. ERO, $Ca^{2+}$ et ouverture du mPTP dans la mort cellulaire

Dans la physiopathologie, il est maintenant largement admis que la mort cellulaire au cours de la reperfusion post-ischémique est médiée par l'activation du mPTP (Halestrap et al., 2004). L'acidose cellulaire au cours de l'ischémie maintient le mPTP en conformation fermée et ce malgré un découplage de la respiration mitochondriale, une augmentation du  $Ca^{2+}$  ainsi qu'une élévation du stress oxydant mitochondrial. En effet, l'inhibition de l'O<sub>2</sub> est la conséquence directe de la privation d'O<sub>2</sub>. Ceci est associé à une chute du  $\Delta\Psi_m$ , l'ATP synthase hydrolyse alors l'ATP pour maintenir le  $\Delta\Psi_m$ , ce qui participe à la déplétion en ATP. La production anaérobie d'ATP par la glycolyse est dans un premier temps stimulée mais l'absence d'O<sub>2</sub> entraîne une accumulation des produits de la glycolyse (acide lactique et les protons) et aboutit à une diminution du pH intracellulaire. Cette acidification du milieu intracellulaire protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire au cours de l'ischémie et dans les premières minutes de la reperfusion en inhibant l'ouverture du mPTP.

Au cours de la reperfusion, la normalisation du pHi, associée à l'établissement d'un cercle vicieux entre la surcharge calcique et l'augmentation d'ERO (Görlach et al., 2015; Zorov et al., 2000) conduisent à l'activation du mPTP. En effet, Zorov et al., (2000) démontrent par microscopie confocale, sur un modèle de production d'ERO contrôlée (par photo excitation) sur des cardiomyocytes isolés, que la production d'ERO conduit à l'activation du mPTP (Zorov et al., 2000). Ce phénomène aboutit à une auto-amplification de la production d'ERO, par un phénomène de « ROS-induced ROS release » (Zorov et al., 2000, 2014). Il semblerait que les effets délétères du  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de l'IR s'expliquent par une augmentation de la sensibilité du mPTP à ce dernier. En effet, Griffiths et son équipe rapportent que l'utilisation de cyclosporine A (CsA), un inhibiteur du mPTP, protège des cellules soumises à une IR (Griffiths and Halestrap, 1993). De manière intéressante, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries viables était plus importante dans les cardiomyocytes préalablement traités avec de la CsA, suggérant que la CsA ne réduit pas le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial, mais module l'activation du mPTP en réponse au  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ainsi, l'ouverture durable du mPTP va être à l'origine d'une soudaine augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale conduisant à une dissipation du potentiel de membrane. La dissipation du potentiel de membrane s'accompagne d'un arrêt de la synthèse d'ATP, mais également de son hydrolyse par l'ATP synthase qui se met à fonctionner en mode inversé. Ceci est associé à une déplétion en  $\text{NAD}^+$ . La transition de perméabilité a pour conséquence un gonflement de la matrice mitochondriale secondaire à une entrée massive d'ions et d'eau dans la matrice mitochondriale. Tout ceci peut finalement conduire à la rupture des membranes mitochondriales et à la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques (cyt c) (Kwong and Molkenin, 2015) (*Figure 12*).



**Figure 12 :** Lésions mitochondriales au cours de l'ischémie-reperfusion.

### A retenir :

- ✚ *La mitochondrie joue un rôle clé dans les lésions observées au cours de l'IR.*
- ✚ *Les dysfonctions mitochondriales au cours de l'IR sont majoritairement caractérisées par i) une surcharge calcique au niveau de la matrice mitochondriale, ii) une importante fuite d'électrons de la CTE aboutissant à une exacerbation de la production d'ERO, et finalement iii) la mise en place d'un cercle vicieux entre ces deux phénomènes aboutissant à l'activation durable du mPTP.*
- ✚ *La mitochondrie et le mPTP sont ainsi considérés comme des cibles clés de nombreuses stratégies de cardioprotection.*

## Chap 2 : Stratégies de cardioprotection : la mitochondrie cible privilégiée des stratégies de cardioprotection

La découverte de stratégies de conditionnement cardiaque permettant de limiter la sévérité des lésions de reperfusion a permis d'identifier des voies de signalisation aboutissant à la protection du myocarde. De plus, la notion de conditionnement ischémique a permis il y a quelques décennies, d'identifier plusieurs voies de signalisation associées à une augmentation de la survie cellulaire. Ces voies de signalisation sont constituées de divers acteurs, qui sont des cibles thérapeutiques potentielles et qui débouchent toutes sur la modulation au niveau mitochondrial de l'activation du mPTP.

### I. Généralités sur le conditionnement cardiaque

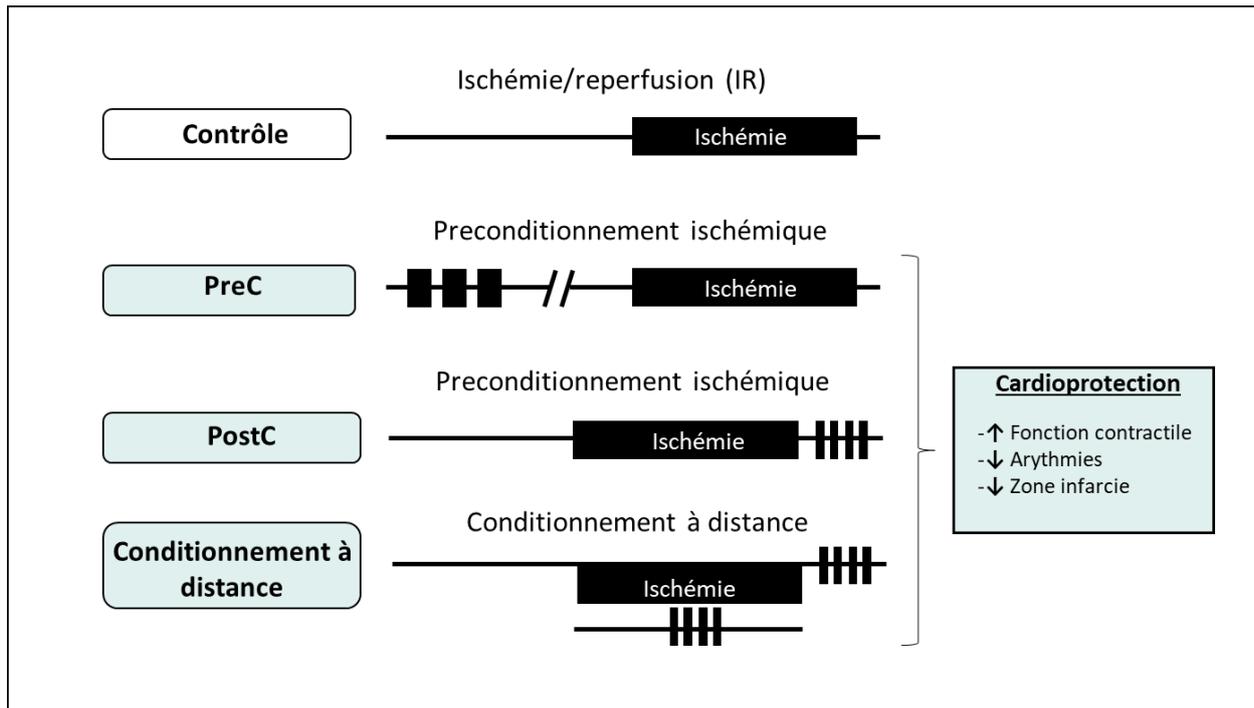
Le conditionnement ischémique peut-être divisé en trois grands types : le préconditionnement, le postconditionnement et le conditionnement à distance (ou « remote conditioning ») (*Figure 13*).

Le **PreC**, initialement décrit par Murry et Reimer (1986), est caractérisé par une répétition de brèves IR avant une ischémie prolongée par occlusion coronaire (Murry et al., 1986)(*Figure 14*). Bien que le PreC soit une des méthodes efficaces pour protéger le myocarde des lésions d'IR, les mécanismes d'action cellulaires mis en jeu demeurent complexes et incomplètement élucidés à ce jour. De plus, cette technique a pour inconvénient d'être difficilement applicable en clinique, notamment à l'infarctus du myocarde dont la survenue est le plus souvent imprévisible.

Zhao (Zhao et al., 2003) a décrit depuis le post-conditionnement ischémique (**PostC**) qui est une forme modifiée de la reperfusion. En effet, de brefs épisodes ischémiques sont réalisés au moment de la reperfusion définitive (*Figure 14*). Ce concept est plus pertinent en pratique clinique, et permet une réduction significative des tailles d'infarctus, via la réduction des lésions de reperfusion.

Le post-conditionnement à distance, une variante du **PostC**, est différent des deux précédents, puisque les périodes d'ischémie et de reperfusion ne sont pas appliquées au niveau cardiaque mais sur un organe distant (*Figure 13*). Cette stratégie est applicable de façon équivalente selon le schéma du pré

ou du post-conditionnement ischémique. Cette technique témoigne de mécanismes paracrines dont les acteurs ne sont pas encore clairement identifiés mais qui aboutissent à l'inhibition du mPTP au cours de la reperfusion (Schmidt et al., 2015).

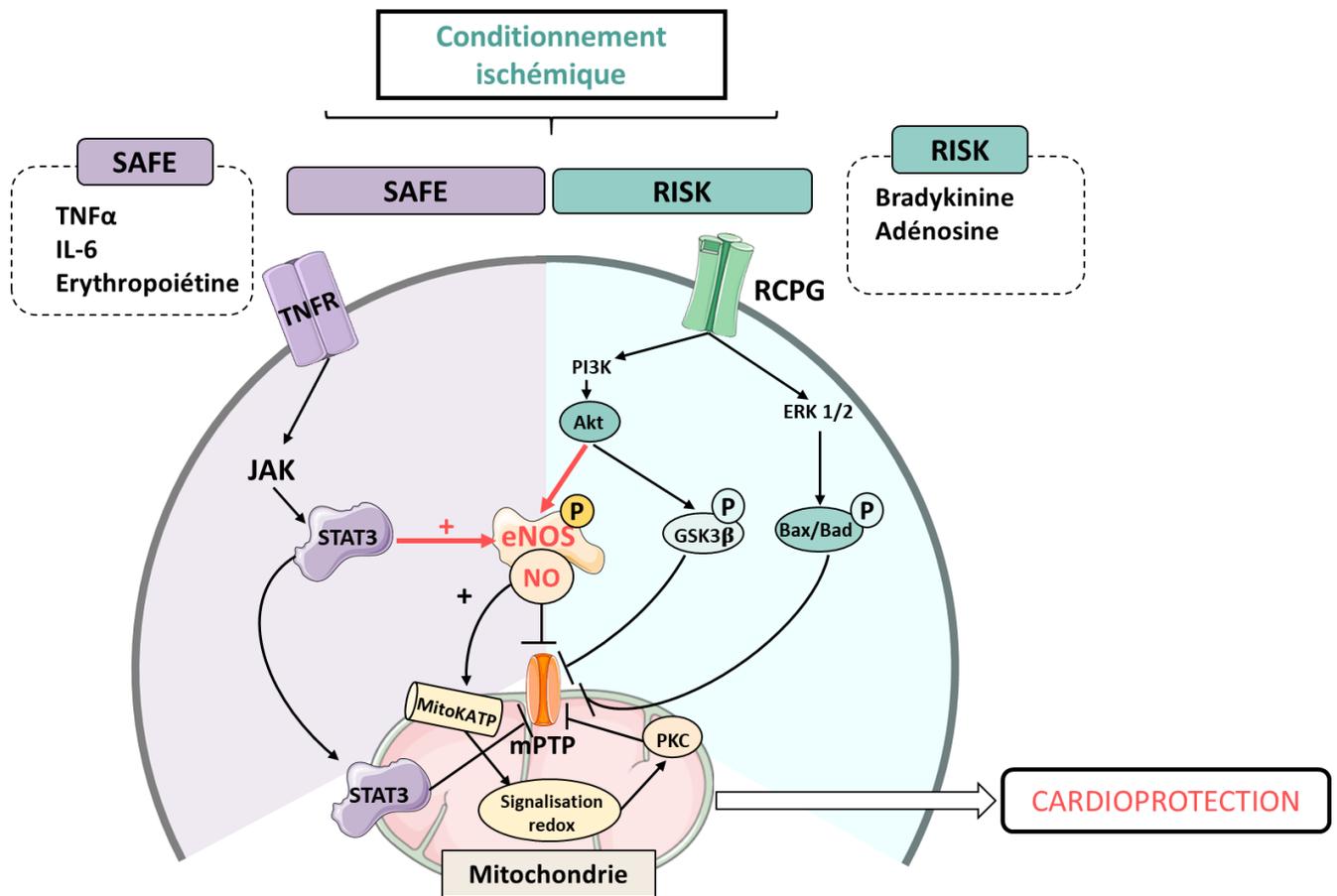


**Figure 13** : Différents types de conditionnement ischémique (Adaptée de la thèse d'Adrien Kleindienst, 2015).

Ces différentes stratégies de cardioprotection ont permis l'identification de voies de signalisation permettant de protéger le cœur au cours de l'IR (Baranich et al., 2018, Conditioning Medicine). Ces voies sont la voie **RISK** (Reperfusion Injury Salvage Kinase) (Hausenloy and Yellon, 2004) et la voie **SAFE** (Survivor Activating Factor Enhancement) (Lacerda et al., 2009). Ces deux voies sont détaillées ultérieurement (*Figure 14*).

Il est intéressant de noter que dans ces voies de cardioprotection, la synthèse de NO par la eNOS semble être un acteur important clé. En effet, la eNOS est connue pour être activée par les voies de

survie cellulaire **RISK** et **SAFE** et semble ainsi jouer un rôle non négligeable dans la cardioprotection induite par le PreC (Chouchani et al., 2013; Pong et al., 2014; Sun and Murphy, 2010; Sun et al., 2007a). Pong et al. (2014) ont ainsi démontré la perte de la cardioprotection induite par le PreC chez des souris déficientes pour la eNOS (Pong et al., 2014). Il démontre également que la phosphorylation d'Akt n'est pas modifiée chez ces souris suggérant que l'activation de la eNOS est nécessaire aux effets protecteurs de la voie **RISK**. Ceci s'explique par la fixation des ligands libérés par les cardiomyocytes lors du conditionnement ischémique (bradykinine, opioïdes endogènes, adénosines), sur leur récepteur à protéine G (RCPG), entraînant l'activation de la voie PI3K/Akt. Akt est capable de phosphoryler la eNOS sur son site activateur (serine1177), provoquant ainsi une augmentation de la synthèse de NO. Les effets bénéfiques du NO semblent être liés à l'activation de la voie Guanylate cyclase (sGC)-GMPC-PKG et provoquent l'ouverture des canaux mitoKATP présents au niveau de la mitochondrie (Costa et al., 2008). Il a été montré que l'ouverture de ces canaux potassiques entraîne l'inhibition de l'ouverture du mPTP, protégeant ainsi l'intégrité de la mitochondrie durant l'IR (Cuong et al., 2006; Lebuffe et al., 2003). En effet, l'ouverture du canal mitoKATP entraîne une augmentation de l'influx de  $K^+$  dans la mitochondrie, provoquant un gonflement et une alcalinisation de la matrice mitochondriale. En conséquence, la chaîne respiratoire mitochondriale se met à fonctionner, ce qui induit la production d' $O_2^{\bullet-}$  (Costa et al., 2008). L' $O_2^{\bullet-}$  est rapidement dismuté par la SOD en  $H_2O_2$  qui active la protéine kinase C (PKC) présente au niveau de la IMM et va à son tour inhiber l'ouverture du mPTP. Ces dernières années, des études ont néanmoins démontré que les effets cardioprotecteurs de la eNOS pouvaient être indépendants de l'activation de la PKG et médiés par une action directe du NO au niveau de protéines clés dans la cardioprotection (Chouchani et al., 2013; Sun and Murphy, 2010; Sun et al., 2007a). Il semble donc, au regard de ces différents travaux, qu'il puisse exister une voie de cardioprotection dépendante de la production de NO par la eNOS.



**Figure 14** : Schéma simplifié des principales voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection : la voie **SAFE** (Survival Activation Factor Enhancement) et la voie **RISK** (Reperfusion Injury Salvage Kinase).

## II. Le NO acteur clé de la cardioprotection

### 1. Généralités sur le NO et sa place dans le système cardiovasculaire

Le NO est à ce jour clairement identifié comme un régulateur clé de l'homéostasie cardiovasculaire. Ce gaz liposoluble, de charge neutre, possède une très forte capacité à diffuser à travers les membranes (Pacher et al., 2007), cette propriété lui permet d'être impliqué dans un certain

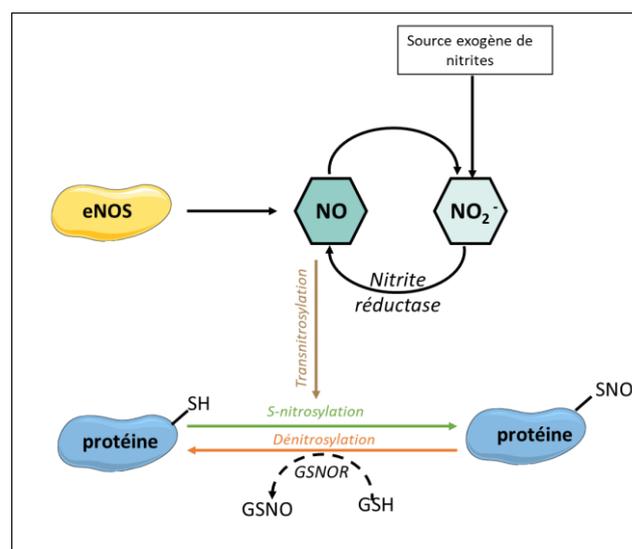
nombre de fonctions cellulaires. En effet, de manière non exhaustive, le NO a un rôle anti thrombotique, antiagrégant plaquettaire, pro-angiogénique, vasorelaxant, hémostatique, et joue également un rôle clé dans la régulation de la fonction myocardique et dans la rythmicité cardiaque (Tuteja et al., 2004). Son rôle dans le système cardiovasculaire a été décrit pour la première fois par Furchgott et Zawadzki en 1980 (Furchgott and Zawadzki, 1980). Ces auteurs ont ainsi démontré l'existence d'un facteur vasorelaxant libéré par l'endothélium vasculaire, alors nommé « Endothelium-Derived Relaxing Factor » (EDRF). C'est en 1987 que ce puissant vasorelaxant fut identifié sous le terme de NO (Ignarro et al., 1987). Depuis, le NO représente donc une molécule clé de la signalisation cellulaire (Moncada and Higgs, 1991) et la mitochondrie représente une cible importante de ses effets. La suite du manuscrit dressera l'état actuel des connaissances sur la biochimie du NO (synthèse et régulation), son rôle dans le système cardiovasculaire et enfin son implication dans la cardioprotection en se centrant plus particulièrement sur son interaction avec les mitochondries.

### 1.1. Synthèse de NO par les NOS

Le NO est majoritairement synthétisé par les synthétases du monoxyde d'azote (NOS), une famille d'enzymes qui catalysent la transformation enzymatique de la L-arginine en L-citrulline grâce à l'O<sub>2</sub> (Figure 15). Les NOS sont présentes dans l'organisme sous 3 isoformes majeures : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), la NOS inductible (iNOS ou NOS2) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3). Une quatrième isoforme mitochondriale (NOSmt) est également rapportée dans la littérature, mais son existence demeure controversée (voir Chap2/II/2.1). Ces isoformes diffèrent principalement par **i)** leur localisation dans la cellule, **ii)** leur caractère constitutif ou inductible et **iii)** la régulation post-transcriptionnelle de leurs activités. En effet, les isoformes neuronale et endothéliale sont toutes les deux exprimées de manière constitutive dans le système cardiovasculaire et leur activité est fortement régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'activité de ces NOS est aussi fortement dépendante de la concentration intracellulaire en Ca<sup>2+</sup>. La iNOS est quant à elle exprimée de manière induite par différents stimuli tels que les stress oxydant et inflammatoire. Son activité est indépendante du Ca<sup>2+</sup>, et contrairement aux isoformes constitutives, son activité est essentiellement déterminée par son niveau d'expression (Umar and van der Laarse, 2010). Alors que les NOS constitutives induisent une synthèse de NO 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 à partir de stocks de métabolites du NO. Ces stocks sont présents sous deux grandes formes : les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et les nitrosothiols (SNO). Les nitrites myocardiques peuvent être réduits en NO grâce à une famille d'enzymes comprenant les nitrites réductases et les myoglobines (Rassaf Tienush et al., 2007). Ces enzymes ont la capacité d'être activées en condition d'acidose et de faible pression en  $\text{O}_2$  (Totzeck et al., 2015; Zweier et al., 1999). De telles conditions peuvent être retrouvées lors d'une ischémie myocardique (Duranski et al., 2005) permettant ainsi de maintenir la biodisponibilité en NO dans ces conditions.

D'autre part, le S-nitrosoglutathion (GSNO), S-nitrosothiol endogène formé par la réaction entre le NO et la forme réduite du glutathion (GSH), peut être à l'origine d'une transnitrosylation au cours duquel le groupement NO pourra se fixer sur les cystéines oxydées des protéines formant ainsi des RSNO. Les mécanismes de dénitrosylation protéique impliquent des réactions enzymatiques (dénitrosylases) et non enzymatiques (ascorbate) (Paige et al., 2008). La dénitrosylation implique des dénitrosylases telles que la S-nitrosoglutathione réductase (GSNOR), enzyme capable de dénitrosyler les protéines en reformant du GSNO à partir du GSH et des thiorédoxines (Trxs). En résumé, comme le montre la *Figure 16*, l'homéostasie cellulaire du NO est régulée par deux mécanismes principaux : la transnitrosylation et la dénitrosylation à travers des réactions enzymatiques et non enzymatiques. Les réactions enzymatiques sont médiées par les S-nitrosylases et les S-dénitrosylases qui contrôlent les niveaux cellulaires de SNO tandis que les réactions non enzymatiques sont majoritairement médiées par l'ascorbate (Xiaomeng and Hongyu, 2020) (*Figure 16*).



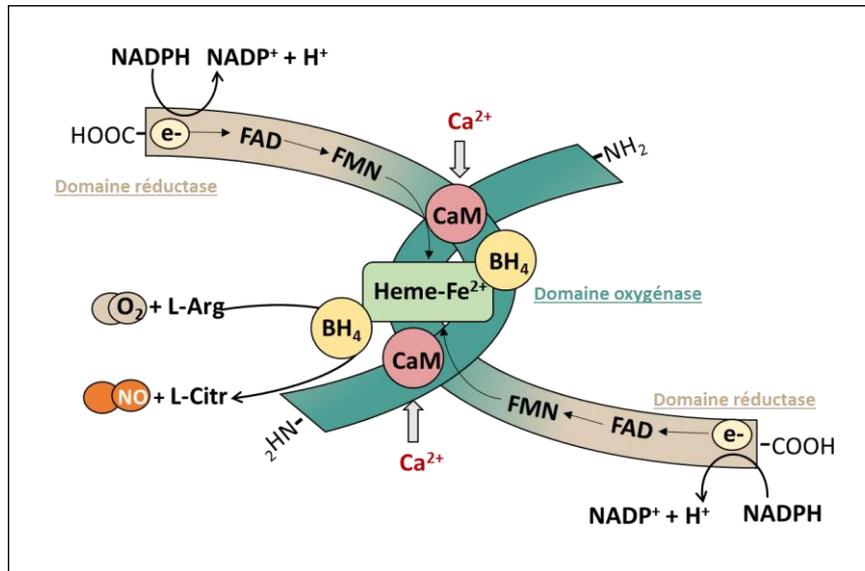
**Figure 15** : Schématisation des mécanismes moléculaires impliqués dans le stockage des métabolites du NO.

Considérant le rôle majeur du NO et de la eNOS dans les voies de cardioprotection, la suite de la revue sera axée principalement sur cette isoforme, sur son interaction avec les mitochondries et sur son rôle dans la cardioprotection.

#### 1.1.1. Synthèse du NO par la eNOS

La eNOS est une enzyme active sous forme d'homodimère et dont chaque monomère est constitué d'un domaine oxygénase N-terminal comprenant les sites de fixation du substrat : la L-arginine, le cofacteur essentiel à l'état dimérique, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), ainsi qu'un groupement hémique. Elle est également constituée d'un domaine réductase C-terminal portant les sites de fixation du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), de la flavine adénine dinucléotide (FAD) et de la flavine mononucléotide (FMN), ainsi qu'un site de fixation du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (CaM) essentiel à son activation par le Ca<sup>2+</sup>. La eNOS est une oxydoréductase, son activité catalytique menant à la synthèse de NO requiert un transfert d'électrons de la NADPH au FAD puis au FMN du domaine réductase d'un monomère, et se termine au groupement hémique du domaine oxygénase de l'autre monomère. Ceci permet la conversion de l'hème ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en son état ferreux (Fe<sup>2+</sup>) et autorise ainsi la fixation de l'O<sub>2</sub> sur la eNOS. En effet, l'hème oxydé est alors capable de fixer l'O<sub>2</sub> et la L-arginine, conduisant à la synthèse de NO et de L-citrulline par oxydation de la L-arginine. (Figure 16).

La présence de BH<sub>4</sub> est essentielle à l'état de couplage fonctionnel de la protéine et donc à la formation du NO. Il participe également à la fixation du substrat, la L-arginine, ainsi qu'au transfert d'électrons. En absence de ce cofacteur, la L-arginine ne peut pas se fixer sur son site au niveau de la protéine, et l'accepteur terminal d'électrons devient le dioxygène, formant ainsi de l'O<sub>2</sub>• au détriment du NO, et ainsi du peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>).



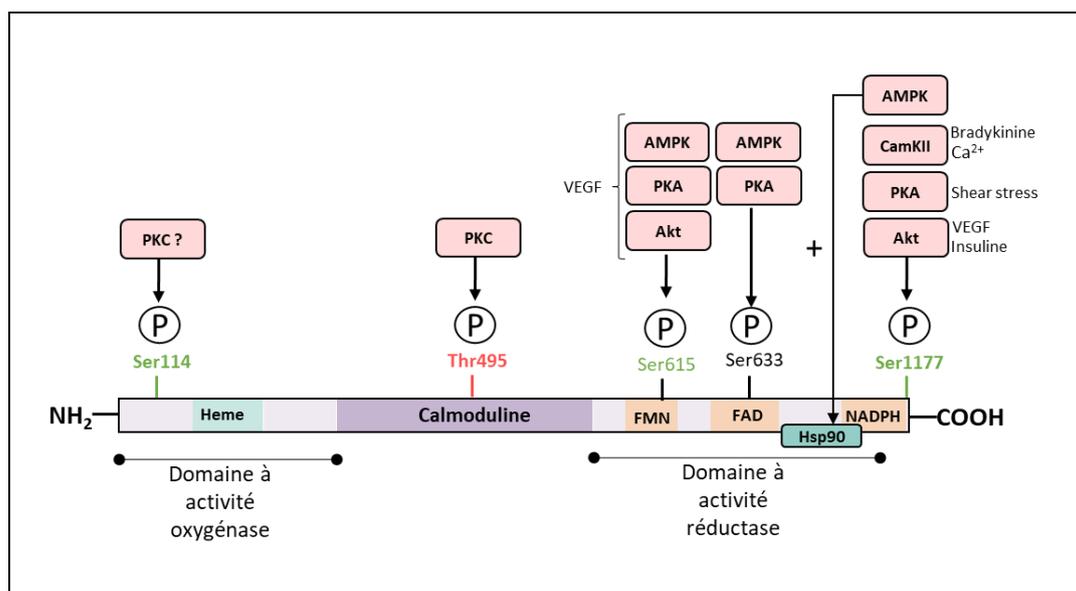
**Figure 16 :** Synthèse du NO par la eNOS.

### 1.1.2. Régulation de son activité (transcriptionnelle et post transcriptionnelle)

L'activité de la eNOS est fortement régulée au niveau post-transcriptionnel et va être dépendante de son interaction avec de nombreuses protéines dont principalement le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ; associé aux cavéolines, la Hsp90 (Heat shock protein 90) (Fleming and Busse, 2003) et à Akt. Cette régulation post-transcriptionnelle implique également de nombreuses modifications post-traductionnelles connues comme régulant la localisation subcellulaire et l'activité de l'enzyme. On retrouve parmi elles la S-nitrosylation, l'acétylation, la glycosylation, la glutathionylation et la (De)phosphorylation (Heiss and Dirsch, 2014). Dans ces travaux de thèse, nous nous intéresserons principalement à la phosphorylation de la eNOS, bien décrite pour son rôle clé dans la régulation de l'activité de l'enzyme.

A l'état basal, la eNOS est ancrée et maintenue dans un état inactif au niveau de la membrane plasmique via les cavéolines (CaV) (isoformes 1 et 3, respectivement endothéliale et cardiomyocytaire) (Feron et Balligand, 2006) qui sont des protéines de structure de la membrane plasmique, responsables de la formation et de la stabilisation des cavéoles (Feron and Balligand, 2006; Feron et

al., 1998). Cette eNOS est maintenue au niveau des cavéoles via différents sites de myristoylation et palmytoylation présents au niveau du domaine oxygénase de l'enzyme (extrémité N-terminale) (Liu et al., 1996). L'activation de la eNOS en réponse à la stimulation d'agonistes (acétylcholine, la bradykinine, le VEGF ou les agonistes des récepteurs  $\beta_3$ -adrenergiques), ou encore en réponse à un stress mécanique (forces de cisaillement ou shear stress) conduit à l'augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  aboutissant à la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  qui rompt l'interaction inhibitrice  $\text{CaV}/\text{eNOS}$ . En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  en se fixant sur la CaM provoque le déplacement de la liaison inhibitrice entre la eNOS et la cavéoline, rendant ainsi la eNOS fonctionnelle. Cette dissociation primordiale à l'activation de la eNOS favorise le recrutement de Hsp90 (protéine chaperonne du cytosol) et d'Akt, qui d'une part à travers la formation d'un complexe protéique favorise l'association de la CaM avec la eNOS et d'autre part participe à la régulation de l'enzyme par phosphorylation (Figure 17), et notamment par phosphorylation du résidu Serine 1177 (Ser 117), principal site activateur de l'enzyme. Cette phosphorylation est associée en parallèle à une déphosphorylation du résidu Thréonine (Thr 495), principal site inhibiteur de la eNOS (Figure 17). Les principaux sites d'activation et inhibition de l'enzyme sont présentés dans la Figure 17. L'activation de la eNOS est à l'origine d'une translocation de celle-ci vers le cytosol. La localisation subcellulaire de l'enzyme est ensuite régulée par des complexes protéiques appelés NOSIP (NO Synthase Interacting Protein) et NOSTRIN (NO Synthase Traffic Inducer), qui favorisent la translocation cytosolique de la eNOS et son adressage aux différents organites intracellulaires (appareil de Golgi, mitochondrie).



**Figure 17** : Représentation des différents sites de phosphorylation de la eNOS et leur rôle dans l'activité de la protéine (Adaptée de Schulz et al., 2009).

## 1.2. Voies de signalisation et cibles cellulaires du NO

### 1.2.1. Voies de signalisation

Bien que le NO ait été découvert pour la première fois pour son rôle fondamental dans le contrôle de la fonction vasculaire (propriétés vasomotrices) (Rapoport et al., 1983), son rôle dans la fonction myocardique est aujourd'hui bien décrit. En effet, ce gazotransmetteur, non seulement produit par les cellules endothéliales coronaires et endocardiques (Palmer et al., 1988), mais aussi par les cardiomyocytes (Petroff et al., 2001), intervient dans la régulation de la perfusion et de la contractilité cardiaque. En effet, celui-ci joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie calcique et la sensibilité des myofilaments au  $Ca^{2+}$  permettant ainsi de réguler le CEC. Cette régulation de la fonction cardiaque par le NO dépend de deux voies de signalisation bien distinctes, **i)** Une voie indirecte impliquant la guanylate cyclase soluble (GCs), responsable de la synthèse de GMPc à l'origine de l'activation de la PKG (Costa et al., 2008; Inserte and Garcia-Dorado, 2015) et **ii)** une voie qui implique la fixation directe du NO sur des groupements thiols des résidus cystéines des protéines, appelée S-nitrosylation protéique (SNOp) (Penna et al., 2014).

La voie GCs/GMPc/PKG est majoritairement impliquée dans la régulation du CEC du myocyte cardiaque (Hare, 2003), principalement en ayant pour cible la phosphorylation des protéines sarcomériques (Layland et al., 2002) et des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique. La voie NO/GCs/PKG a longtemps été considérée comme la principale signalisation cellulaire des NOS, mais depuis une quinzaine d'année, la SNOp a émergé comme un régulateur clé des fonctions cardiovasculaires (Murphy et al., 2014). La S-nitrosylation agit comme un mécanisme de modulation fonctionnelle des protéines (régule l'activité enzymatique, la localisation et la stabilité des protéines) (Hess et al., 2001) et prévient l'oxydation irréversible des résidus cystéines en condition de stress oxydant. Parmi les nombreuses cibles cellulaires de la S-nitrosylation, on retrouve, les protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (i. e. canaux calciques de type L (L-type calcium channel), les RyR, les protéines sarcomériques (Irie et al., 2015; Murphy et al., 2014), mais également les protéines mitochondriales (notamment le complexe I) (*Chap2/II/2.2*).

Comme présenté ci-dessus, la synthèse de NO par la eNOS est aussi considérée comme jouant un rôle clé dans la cardioprotection (Farah and Reboul, 2015; Rassaf et al., 2014). Une grande partie de la cardioprotection offerte par le NO a longtemps été attribuée à l'activation de la GCs (Costa et al., 2008). Des résultats récents obtenus par le groupe d'Elizabeth Murphy, suggèrent que les effets

protecteurs du NO ne sont finalement pas principalement liés à l'activation de la voie de signalisation GCs-GMPc-PKG, mais plutôt à la S-nitrosylation directe des protéines par le NO (Sun and Murphy, 2010; Sun et al., 2013). Ceci a été confirmé par Methner et ses collaborateurs, en 2013 (Methner et al., 2013). En effet, la délétion spécifique de la PKG dans les cardiomyocytes n'avait aucun effet sur la cardioprotection induite par le post-conditionnement ischémique ou sur la cardioprotection induite par l'utilisation de donneurs de NO mitochondrial (mitoSNO). Comme précédemment décrit par Sun et Murphy en 2010, un nombre important de protéines sont s-nitrosylées dans le cœur (Sun and Murphy, 2010). Bien que la régulation des protéines régulatrices de l'homéostasie calcique (L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel, SERCA2a), par S-nitrosylation apparait pouvoir jouer un rôle non négligeable dans la cardioprotection au cours de stress oxydants importants comme lors de l'IR, la majorité des protéines s-nitrosylées avec le conditionnement ischémique correspondent néanmoins à des protéines mitochondriales. La suite de cette revue de littérature présentera un bilan de l'impact du NO et de la S-nitrosylation sur la fonction mitochondriale dans la cardioprotection.

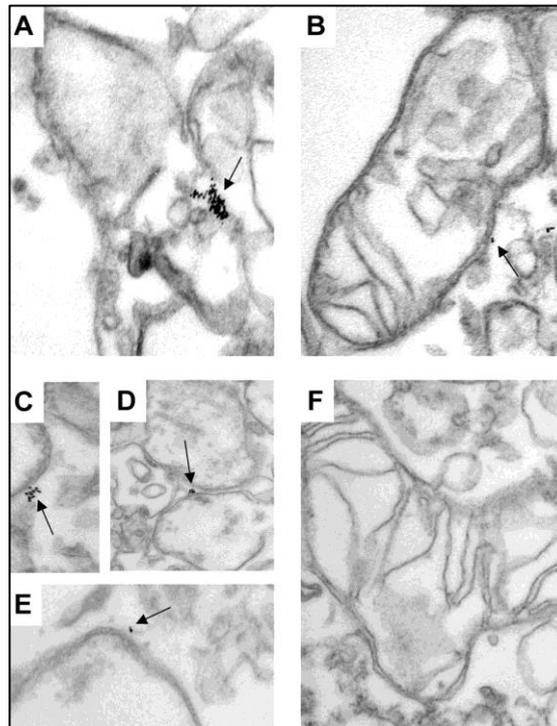
## 2. NO mitochondrial et cardioprotection

### 2.1. NOSmt

On sait aujourd'hui que le NO peut être produit au niveau des mitochondries et que celui-ci est essentiel à la régulation de la fonction mitochondriale. Néanmoins, l'existence d'une NOS exclusivement mitochondriale (mtNOS) reste aujourd'hui très controversée (Lacza et al., 2009). En effet, malgré des preuves, immunohistochimiques (Bates et al., 1996), biochimiques (Boveris et al., 2003; Elfering et al., 2002; Gonzales et al., 2005; Zanella et al., 2002) et spectrophotométriques (Costa et al., 2003) de l'existence d'une NOS mitochondriale, des doutes concernant son existence, sa nature et sa localisation persistent. Ce scepticisme est principalement attribué à l'impureté des préparations mitochondriales. En effet, les NOS détectées dans les fractions mitochondriales pourraient être liées à la contamination par les NOS d'autres organites et fractions membranaires. Concernant la nature de la NOS mitochondriale, les 3 isoformes de NOS (eNOS, nNOS, iNOS) ont été proposées comme candidat. Cependant, dans le cœur, les données les plus convaincantes impliquent la nNOS (Dedkova and Blatter, 2009a; Kanai et al., 2001)(Kanai et al, 2001, PNAS), même si d'autres études sont plus en faveur de la eNOS (Bates et al., 1996; Gao et al., 2004). L'équipe de Lacza (Lacza et al., 2003) quant à

elle a été incapable d'associer la production de NO à l'une des 3 isoformes connues des NOS, et a donc émis l'hypothèse de l'existence d'une nouvelle NOS d'origine bactérienne (Lacza et al., 2009). Quelques preuves indirectes suggèrent que la NOS mitochondriale serait localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. En effet, des résultats en immunohistochimie suggèrent que celle-ci co-localise avec le complexe II (succinate déshydrogénase) de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kobzik et al., 1995). Néanmoins, aucune preuve ne démontre aujourd'hui que les NOS traditionnelles (eNOS, nNOS et iNOS) présentent des séquences permettant le passage de la membrane interne mitochondriale. On sait cependant que les NOS peuvent être associées à la membrane externe mitochondriale afin de réguler la production de NO dans l'environnement proche des mitochondries. En effet, Reinier et al. (2001) ont démontré par microscopie immunoélectronique sur des cellules endothéliales intactes que la eNOS serait localisée au niveau de la membrane externe (Reiner et al., 2001). Ceci a été confirmé par Gao et al. (Gao et al., 2004). Ces auteurs ont pu démontrer de manière élégante que la eNOS était capable de se lier à la membrane externe mitochondriale (côté cytosol) sur un peptide clivable par la protéinase K, une séquence d'acide aminés pentabasique (de 628 à 632) présente au niveau du domaine auto-inhibiteur de la eNOS (dans le domaine réductase de l'enzyme) (Nishida and Ortiz de Montellano, 1999) (*Figure 17 et Figure 18*). La fixation de l'enzyme par son domaine auto-inhibiteur, désinhiberait son activité enzymatique permettant ainsi la synthèse de NO à proximité des mitochondries (*Figure 18*).

Même si la nature de la NOS mitochondriale reste encore énigmatique, tous les travaux sur le sujet ont permis d'affirmer le fait que la production de NO pouvait être très localisée au niveau mitochondrial. La suite de la revue s'intéressera au rôle de l'interaction entre NO et mitochondrie dans la cardioprotection.



**Figure 18 :** (A-E)- Localisation de la eNOS sur la membrane externe de mitochondries isolées de cellules endothéliales (HUVEC). Les images sont obtenues par microscopie immunoélectronique, la eNOS est marquée avec un anticorps anti-eNOS. (F)- Un traitement à la protéinase K abolie en grande partie le marquage de la eNOS à la membrane externe mitochondriale (Gao et al., 2004).

## 2.2. NO et mitochondrie : quel rôle dans la cardioprotection

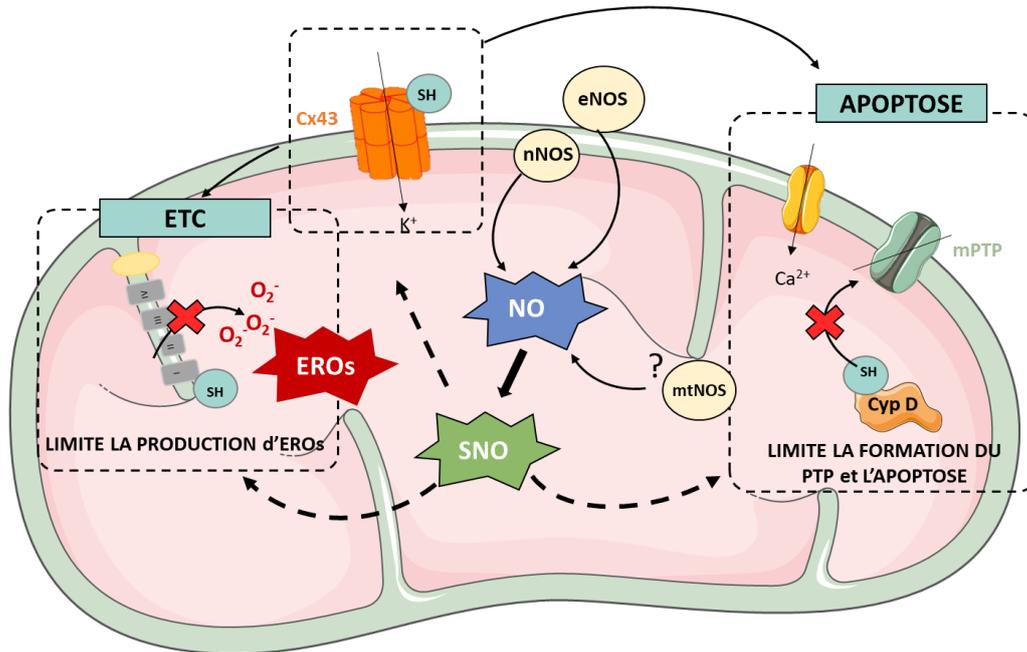
Le NO est un puissant régulateur de la fonction mitochondriale (régule la respiration mitochondriale, la production d'ERO et la biogénèse mitochondriale) (Erusalimsky and Moncada, 2007; Piantadosi, 2012) et est reconnu comme un agent cardioprotecteur endogène à cibles multiples (Rassaf et al., 2014). Comme décrit précédemment, la voie GMPc/PKG mais surtout la voie eNOS-NO/SNO joue un rôle clé dans les voies de cardioprotection (Burwell and Brookes, 2007) et la mitochondrie est une cible primordiale de ces différentes stratégies de cardioprotection. En effet, il a été démontré que l'activation de la voie GMPc/PKG retarde l'ouverture du mPTP et empêche ainsi la mort cellulaire par apoptose d'astrocytes en culture (Takuma et al., 2001). De plus, la stimulation de la voie NO/GMPc réduit les oscillations calciques en provenance du RS et prévient ainsi l'hypercontracture et la rupture du sarcolemme dans les premières minutes de la reperfusion. Tout ceci permet finalement de réguler l'ouverture du mPTP (Garcia-Dorado et al., 2009).

Comme décrit précédemment, la SNOp est récemment apparue comme un acteur majeur de la cardioprotection induite par le NO (Sun and Murphy, 2010; Sun et al., 2013). Des stratégies de conditionnement ischémique ont pu mettre en évidence l'importance de la S-nitrosylation et des SNO mitochondriaux dans la cardioprotection induite par le NO (Burwell et al., 2006; Sun et al., 2007a). Sun et Murphy ont ainsi pu démontrer en 2012 que la plupart des protéines s-nitrosylées au cours du PreC sont des protéines mitochondriales (52% du S-nitrosoproteome total) (Murphy et al., 2012; Sun and Murphy, 2010). De manière intéressante, la SNOp influence de nombreuses fonctions mitochondriales, telles que l'homéostasie calcique, la production d'ERO, l'ouverture du mPTP et la respiration mitochondriale (Borutaite and Brown, 2006). Tout ceci permettant d'expliquer du moins en partie la cardioprotection induite par le NO. Chouchani et al. (2013) ont pu proposer que cette protection pouvait s'expliquer par la S-nitrosylation spécifique de la cystéine 39 (Cys39) de la sous-unité ND3 du complexe I de la CTE (Chouchani et al., 2013). En effet, l'inhibition réversible de ce complexe au cours de la reperfusion post-ischémique limite la production d'ERO, acteur majeur des lésions au cours de l'IR. L'utilisation d'un donneur de NO mitochondrial, le mitoSNO, inhibe également la respiration mitochondriale en entrant en compétition avec l'O<sub>2</sub> sur le groupe hème ferrique du complexe IV (cytochrome c oxydase) de la CTE (Methner et al., 2014; Prime et al., 2009). De plus, la liaison du NO au complexe IV (cytochrome c oxydase) confère une résistance cellulaire à l'apoptose (Cooper and Brown, 2008). Il a également été démontré que la S-nitrosylation de la Cyp D, un régulateur critique de l'activation du mPTP, préserve l'intégrité mitochondriale pendant l'IR (Bibli et al., 2019). De manière plus précise, Nguyen TT et al. (2011) ont démontré que la Cyp D était s-nitrosylée au niveau de sa cystéine 203, ce qui permettrait de prévenir son oxydation au cours de la reperfusion post-ischémique (Nguyen et al., 2011). En effet, au cours de l'ischémie, la dé-acylation de la Cyp D libère la protéine dans la matrice mitochondriale, augmentant ainsi sa probabilité d'interaction avec le mPTP. Amanakis et al. (2020) ont récemment démontré que la S-nitrosylation de la Cyp D prévient sa dé-acylation au cours de l'IR et empêche ainsi l'activation du mPTP (Amanakis et al., 2017). Certaines études suggèrent également que la S-nitrosylation de la Cx43 protéine de jonction communicante impliquée dans la respiration mitochondriale (Boengler et al., 2012), le statut redox mitochondrial (Denuc et al., 2016), et l'homéostasie calcique (Xu et al., 2012) participe à la cardioprotection médiée par le NO (Soetkamp et al., 2014).

L'existence d'une NOS mitochondriale restant aujourd'hui très controversée (*Chap2/II/2.1*), on pourrait alors se demander quelles sont les sources du NO au niveau de la mitochondrie. Sun et al. (2013), ont pu démontrer que l'utilisation de methyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), afin d'altérer les

cavéoles et ainsi empêcher l'association de la eNOS avec la Cav3 abolit la S-nitrosylation des protéines mitochondriales suite au PreC et par conséquent la cardioprotection induite par la SNO (Sun et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la Cav3 est impliquée dans la transduction de la signalisation cardioprotectrice eNOS/NO/SNO vers les mitochondries (Sun et al., 2012). Une étude plus récente menée par le même groupe confirme le rôle de la voie eNOS/NO/SNO dans la protection des mitochondries. En effet, les auteurs suggèrent que le PreC ischémique est à l'origine d'une translocation de la eNOS vers les SSM (Sun et al., 2015b). Cette stratégie aboutit à une augmentation de la S-nitrosylation des protéines mitochondriales et diminue l'activation du mPTP au cours d'un stress calcique (Sun et al., 2015b). C'est d'autant plus intéressant qu'il a été rapporté que la eNOS est la seule isoforme des NOS capable d'être adressée à des sous compartiments membranaires (cavéole, appareil de Golgi) et que celle-ci a également la capacité d'aller se fixer à la membrane externe mitochondriale, afin de produire localement du NO (Gao et al., 2004). Ceci a pu être associé à une hausse généralisée de la SNOp dans ce compartiment.

Il semble donc que la bio-disponibilité du NO au niveau mitochondrial puisse être un élément non négligeable afin de moduler la sensibilité du cœur à un stress tel que l'IR. Il est important de noter que les effets protecteurs de la S-nitrosylation sur les protéines mitochondriales sont multi cibles et la production de NO mitochondriale semble provenir de différentes sources (*Figure 19*). La eNOS semble néanmoins pouvoir jouer un rôle majeur dans ce phénomène. L'effet bénéfique du NO sur les mitochondries est dépendant de sa concentration. En effet, des concentrations faibles de NO (de 100 nM à 1  $\mu$ M) se sont avérées protectrices vis-à-vis des mitochondries lors de stress tel que l'IR (dose), tandis qu'une surproduction de NO (> 5  $\mu$ M) (par la iNOS notamment) a plutôt montré des effets délétères en réagissant avec l' $O_2^{\bullet-}$  pour former du ONOO $^-$  et d'autres espèces azotées réactives nuisibles pour la cellule (Ferdinandy and Schulz, 2003). Le stress nitrooxydant, par le biais d'une nitration de la tyrosine, pourrait également contribuer au dysfonctionnement mitochondrial pendant l'IR (Tatarkova et al., 2019).



**Figure 19** : Impact du NO et de la S-nitrosylation sur la mitochondrie.

### III. Stratégies antioxydantes ciblant la mitochondrie

#### 1. Traitements antioxydants non ciblés

Comme discuté dans le chapitre précédent (*Chap 1/II/2*), un des éléments majeurs dans l'induction de l'ouverture du mPTP et de la mort cellulaire au cours de l'IR est la production d'ERO d'origine essentiellement mitochondriale. Bien que le cœur soit bien équipé en défenses antioxydantes qui comprennent des antioxydants enzymatiques (i.e la SOD, la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (Cat) et des antioxydants non enzymatiques (tel que l' $\alpha$ -tocophérol : vitamine E, l'acide ascorbique : vitamine C, le glutathion), au cours de l'IR les défenses antioxydantes sont dépassées, aboutissant ainsi à la genèse d'un stress oxydant. Il n'est donc pas surprenant, que tout un pan de la recherche se soit concentré sur les effets potentiellement protecteurs de stratégies basées sur des antioxydants.

## 1.1. Généralités sur les antioxydants

Les antioxydants myocardiques sont définis comme des substances qui inhibent ou retardent (même à de très faibles concentrations) l'oxydation de biomolécules sensibles (lipides, protéines, glucides, acides nucléiques) et dont l'utilisation est une priorité pour le bon fonctionnement de l'organisme. Une très grande gamme d'antioxydants naturels et synthétiques est aujourd'hui disponible et leurs mécanismes d'action sont pour la plupart bien connus. En effet, les antioxydants protègent leurs cibles par divers mécanismes qui sont : **1)** le piégeage des ERO et de leurs précurseurs, **2)** la chélation sous forme inerte des métaux de transition ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ) produisant des ERO (réaction de Fenton), **3)** l'inhibition des enzymes pro-oxydantes ou impliquées dans la production d'ERO, et **4)** la régénération d'antioxydants endogènes (i. e.  $\alpha$  tocophérol).

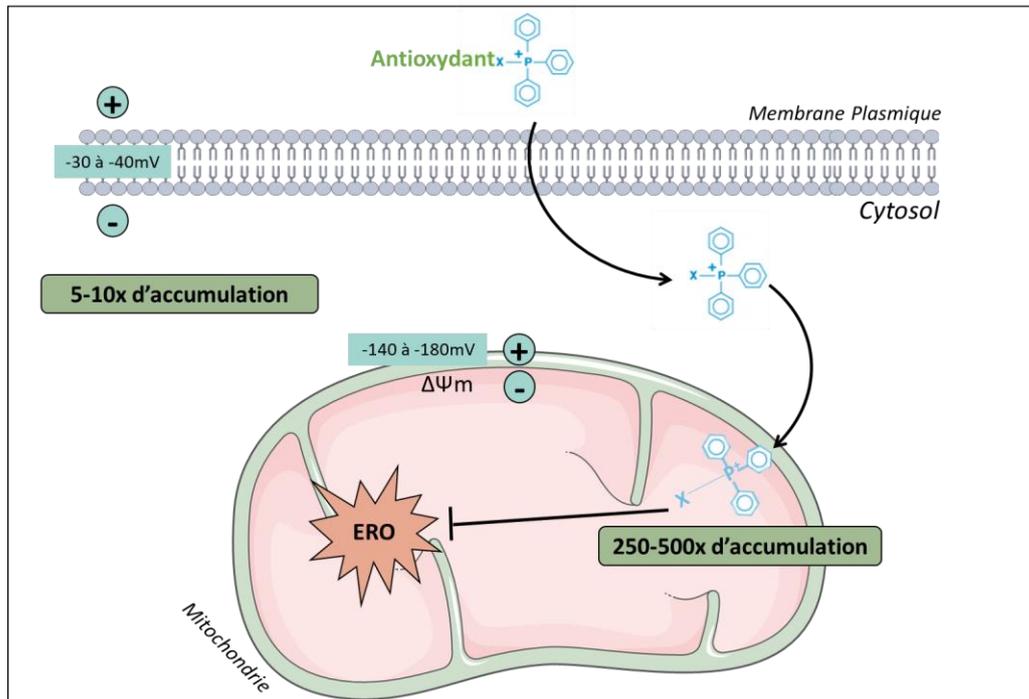
On sait qu'une alimentation riche en produits végétaux (fruits, légumes et produits dérivés), nous apporte une grande variété d'antioxydants tels que la vitamine E ( $\alpha$ - tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), les caroténoïdes et les polyphénols. La vitamine E est une substance liposoluble qui est principalement associée aux lipoprotéines plasmatiques. Elle est reconnue comme étant un puissant piègeur de radicaux peroxydes en inhibant la peroxydation lipidique (Spencer et al., 1999). De nombreuses études expérimentales sur le rongeur ont démontré des effets protecteurs de la vitamine E. Des études menées sur le rat ont rapporté une diminution de la mortalité et de la taille de l'infarctus suite à une supplémentation en vitamine E (Sethi et al., 2000). En accord avec ces résultats, Quinn et al. (2006) démontrent que l'administration d'une combinaison de vitamines C et E à des lapins après ligature des artères coronaires améliore la fonction cardiaque en comparaison à un placebo (Qin et al., 2006). Malgré l'efficacité d'un très grand nombre de ces composés au plan expérimental, les résultats des études cliniques sur le sujet demeurent décevants voir parfois inverses aux effets attendus (Knekt et al., 2004; Marchioli, 2001; McQueen et al., 2005). Cela pourrait s'expliquer principalement par l'utilisation d'antioxydants non spécifiques. En effet, la majorité des antioxydants connus aujourd'hui ont une action globale et manque de spécificité (cytosolique ou plasmatique comme le resvératrol). Si l'on considère que les ERO sont des molécules importantes dans la signalisation cellulaire et participent à l'activation de certains mécanismes cardioprotecteurs, il n'est donc pas totalement incohérent que l'utilisation d'antioxydants non ciblés puisse être associée à des résultats controversés (Bjelakovic et al., 2007; Ristow, 2014; Ristow et al., 2009).

Depuis peu, de nouvelles molécules anti-oxydantes capables de se concentrer au niveau de la mitochondrie et ainsi de cibler les désordres fonctionnels de cet organe au cours de l'IR ont été développées et semblent être à l'origine de résultats prometteurs.

## 2. Antioxydants de synthèse ciblant la mitochondrie

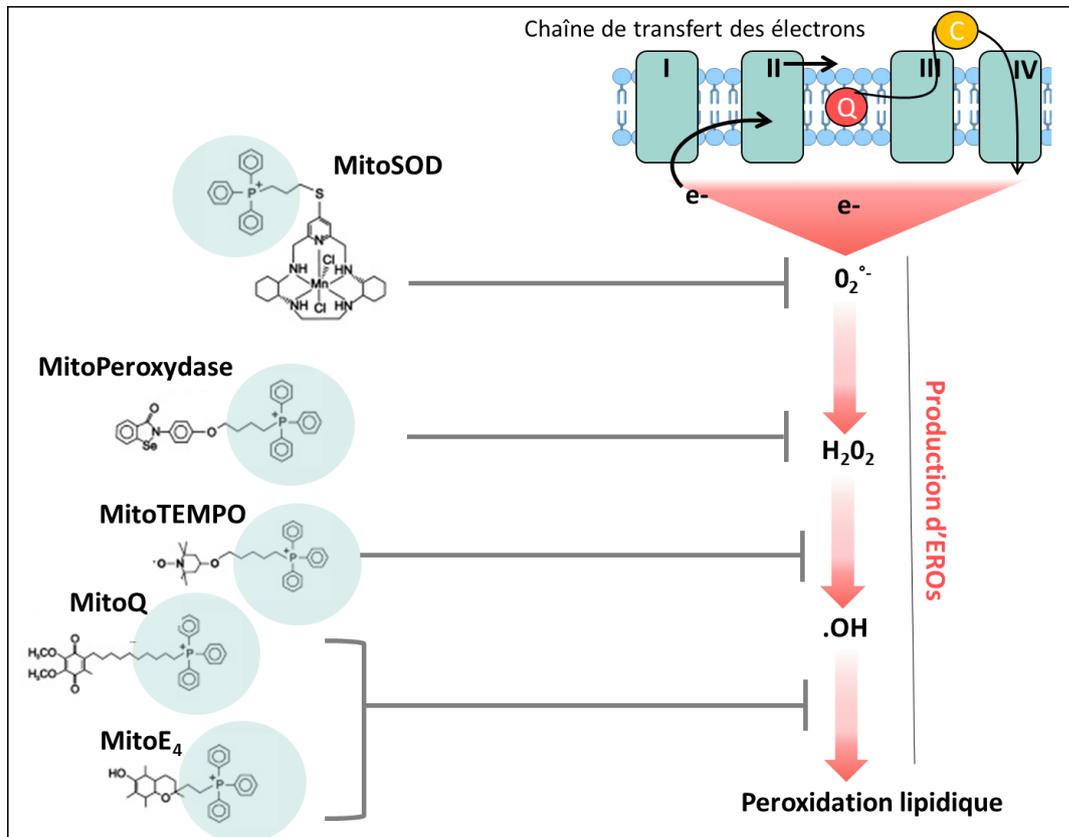
### 2.1. Cations lipophiles

Les travaux menés par l'équipe de Mike Murphy au sein du mitochondrial research center de l'université de Cambridge, ont permis le développement de molécules permettant de cibler spécifiquement les mitochondries, on parle alors de tropisme mitochondrial. Ces chercheurs ont en effet développé des cations lipophiles sur lesquels ils sont capables de « greffer » des molécules tels que des antioxydants, des donneurs de NO ou encore des sondes fluorescentes. Ces cations tirent avantage du  $\Delta\Psi_m$  pour faciliter leur ciblage et leur accumulation dans la matrice mitochondriale (Ross et al., 2008). En effet, le  $\Delta\Psi_m$  étant très électronégatif (-140 à -180 mV), les cations lipophiles peuvent utiliser cette force électromotrice pour franchir les membranes mitochondriales et s'accumuler dans la matrice (Ross et al., 2005). De nombreux cations lipophiles comme le TPP<sup>+</sup> ; la rhodamine 123, la flupirtine, la MKT-077 et les anthracyclines sont aujourd'hui connus comme pouvant passer les membranes cellulaires et s'accumuler spécifiquement au niveau mitochondrial (Frantz and Wipf, 2010). Les cations TPP<sup>+</sup> et TPMP<sup>+</sup> (forme méthylée du TPP<sup>+</sup>), découverts pour la première fois par Liberman et al. (1969) et utilisée comme des indicateurs du  $\Delta\Psi_m$  (Liberman et al., 1969), sont les cations lipophiles les plus largement utilisés pour le ciblage de la mitochondrie par des antioxydants (Murphy and Smith, 2000, 2007). Une fois à l'intérieur des mitochondries, les molécules TPP<sup>+</sup> s'ancrent à l'IMM mitochondriale face à la matrice mitochondriale (Murphy and Smith, 2007) (Figure 20).



**Figure 20** : Ciblage de la mitochondrie par des cations TPP<sup>+</sup> conjugués à des antioxydants (Adaptée de Apostolava et Victor, 2015).

Cette stratégie offre ainsi un moyen très sélectif de fournir des antioxydants cationiques aux mitochondries afin de cibler les ERO directement au niveau de leurs sites de production. De nombreux dérivés de ces conjugués TPP<sup>+</sup> ont émergé en fonction du type d'ERO ciblé et se sont montrés efficaces pour limiter la production d'EROmt. On retrouve le TPP<sup>+</sup>-ubiquinone (MitoQ) (Kelso et al., 2001), le TPP<sup>+</sup>- $\alpha$ -tocophérol (MitoE) (Smith et al., 1999), le TPP<sup>+</sup>-Tempol (MitoTEMPO) (Vendrov et al., 2015), le TPP<sup>+</sup>-SOD (MitoSOD) et le TPP<sup>+</sup>-Peroxydase (Mito-Peroxydase) (Figure 21). Ces modulateurs redox ainsi synthétisés ont été rapporté comme limitant la production d'une grande variété d'ERO (d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, °OH-, les peroxydes lipidiques, etc..) et sont très efficaces contre la peroxydation lipidique, caractéristique des dommages oxydatifs.



**Figure 21** : Synthèse de cations lipophiles couplés à un antioxydant capable de cibler le stress oxydant mitochondrial. La chaîne respiratoire mitochondriale produit du superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), qui peut libérer du fer ferreux, se dismuter en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ; puis via la réaction de Fenton former du radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) et conduire à la peroxydation lipidique (Adaptée de Murphy et Smith, *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2007).

On sait aujourd'hui que la vitamine E est un antioxydant efficace permettant de protéger la membrane mitochondriale du stress oxydant (Lang et al., 1986; Lauridsen and Jensen, 2012; Napolitano et al., 2019; Sokol et al., 1998). Il a été rapporté que le radical  $\alpha$ -tocophéroxyle formé lors de la détoxification des ERO par la vitamine E est recyclé en sa forme active par le pool d'ubiquinol présent au niveau mitochondrial (Maguire et al., 1992) démontrant que les mitochondries régénèrent en permanence l'antioxydant sous sa forme active. Malgré la présence de la vitamine E au niveau mitochondrial, les effets mitochondriaux de cette molécule restent limités. Le premier antioxydant couplé à un TPP<sup>+</sup> : le MitoE<sub>2</sub> ou MitoVitE, composé du fragment  $\alpha$ -tocophérol conjugué à un TPP<sup>+</sup> a été créé afin de répondre à cette problématique. Tout comme la vitamine E, le mitoVitE réduit la

production d'ERO induite et limite ainsi la peroxydation lipidique. Ce composé est également connu pour inhiber la libération de cyt c limitant l'activation de la caspase 3, la fragmentation de l'ADN et ainsi la mort cellulaire.

### 2.1.2. Le MitoQ

Le MitoQ ou Mitoquinone, développé par le groupe Mike Murphy à Cambridge, correspond à la fixation d'un fragment ubiquinone sur un cation TPP<sup>+</sup> (Kelso et al., 2001; Oyewole and Birch-Machin, 2015). Au sein des mitochondries le MitoQ se localise dans la membrane mitochondriale interne où il est réduit en ubiquinol par le complexe II de la CTE. Celui-ci fonctionne à la fois comme un transporteur d'électrons afin de faciliter le transfert d'électrons des complexes I/II au complexe III et comme un antioxydant efficace contre la peroxydation lipidique (Kelso et al., 2001). *In vitro*, le MitoQ réduit efficacement les dommages oxydatifs et protège contre la mort cellulaire induite par l'IR (Neuzil et al., 2007). Une étude *in vivo* menée sur des rats confirme ces résultats (Adlam et al., 2005). En effet, Adlam et al. (2005) ont démontré que l'administration de MitoQ dans l'eau de boisson chez des rats s'est avérée efficace pour réduire la production d'ERO dans les toutes premières minutes de la reperfusion (Adlam et al., 2005). Ceci conduit à une réduction considérable du dysfonctionnement cardiaque, de la mort cellulaire et des dommages mitochondriaux après une IR (Adlam et al., 2005).

### 2.1.3. Le MitoTEMPO

Le MitoTEMPO est un autre groupe d'antioxydants efficace pour cibler les EROmt (Trnka et al., 2008). En effet, ce composé combine un antioxydant, le nitroxyde de pipéridine (TEMPO, mimetic de la SOD) avec un cation lipophile. Cette molécule s'est montrée efficace pour détoxifier l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et pour oxyder l'ion ferreux libre, afin de diminuer la formation de radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) par la réaction de Fenton (Mitchell et al., 1990). De manière intéressante, ce composé a permis de réduire le stress oxydant au cours de l'IR. En effet, l'utilisation de MitoTEMPO a pu induire une protection contre les lésions de reperfusion (Ni et al., 2016a). Ce composé a également été montré comme étant efficace dans d'autres pathologies cardiaques telles que : la cardiomyopathie hypertrophique (Dey et al., 2018) ou la cardiomyopathie diabétique (Ni et al., 2016b).

#### 2.1.4. Dérivés cationiques de la plastoquinone

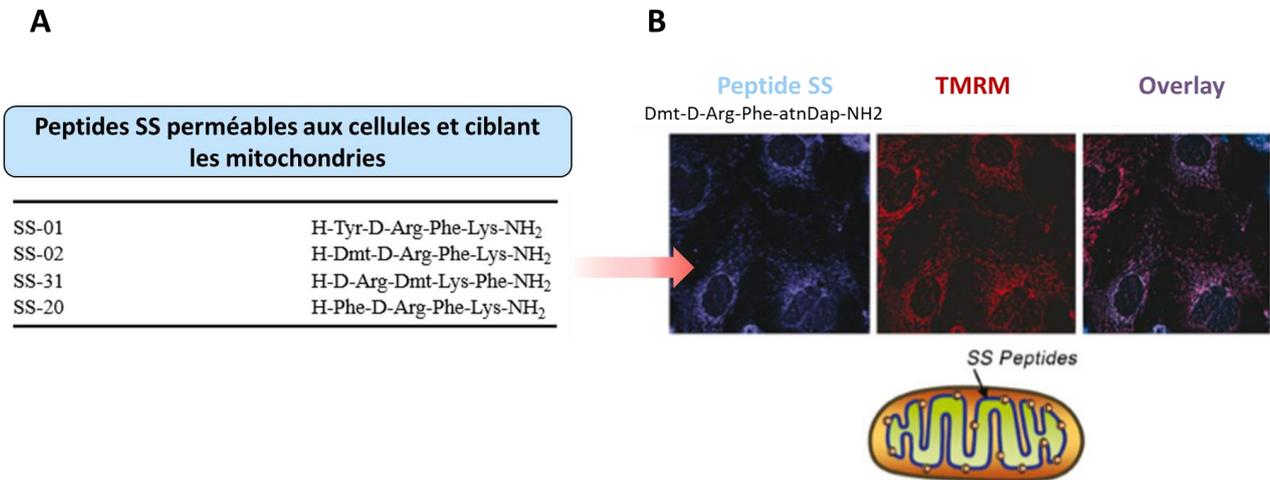
Les dérivés cationiques de la plastoquinone (SkQs : palastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium) se sont également montrés efficaces pour cibler le stress oxydant mitochondrial. En effet, SkQ1, qui comprend un groupement plastoquinone, cible la mitochondrie par conjugaison à un TPP<sup>+</sup> (Bakeeva et al., 2008). Une fois dans les mitochondries, le SkQ1 est réduit en SkQ1H<sub>2</sub> par la chaîne respiratoire mitochondriale. SkQ1 agit comme un antioxydant en limitant la peroxydation de la cardiolipine mitochondriale (Antonenko et al., 2008) et en inhibant la formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

## 2.2. Ciblage basé sur les peptides

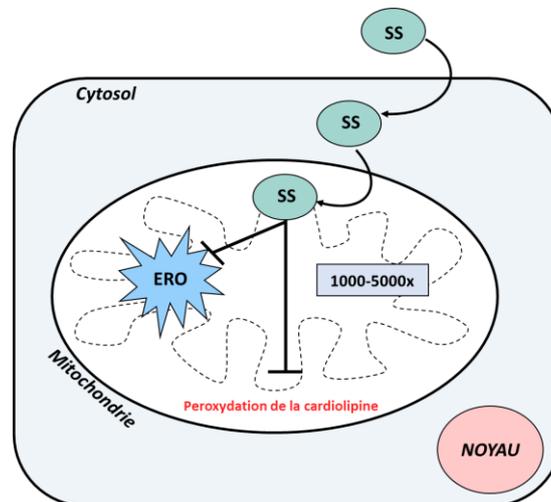
En plus des cations lipophiles, les antioxydants peptidiques SS (Szeto-Schiller) représentent une autre stratégie efficace afin de cibler et de protéger les mitochondries du stress oxydatif (Zhao et al., 2004). Ces peptides sont des composés cationiques-aromatiques, dont le motif structural est basé sur l'alternance de résidus aromatiques et d'acides aminés basiques (Zhao et al., 2004) (*Figure 22-A*). Ils sont reconnus pour leurs capacités à piéger l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le ONOO<sup>-</sup>. Leur action antioxydante peut être due au résidu tyrosine ou diméthyltyrosine de leur séquence. En effet, la tyrosine est capable de piéger les ERO formant des radicaux tyrosyles beaucoup moins réactifs. Ces petits peptides contiennent une séquence d'acides aminés leur permettant de passer librement les membranes mais également une séquence leur permettant de s'accumuler au niveau de la mitochondrie. Contrairement aux cations lipophiles classiques comme le MitoQ, l'absorption de ces peptides aromatiques-cationiques au niveau de la mitochondrie ne dépend pas du  $\Delta\Psi_m$  et se localisent au niveau de la membrane mitochondriale interne plutôt qu'au niveau de la matrice (Szeto, 2006; Szeto and Schiller, 2011) (*Figure 22-B*).

Comme décrit précédemment ; la peroxydation de la cardiolipine au cours de l'IR, conduit à la libération du cyt c dans le cytosol suite à l'activation du mPTP. De manière intéressante, en réduisant les EROmt et en ciblant la cardiolipine, les peptides SS (SS-02 et SS-31) ont pu inhiber l'ouverture du mPTP, prévenant ainsi le gonflement mitochondrial et la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques en réponse à une surcharge calcique (Birk et al., 2013; Broome et al., 2018) (*Figure 23*).

Tout ceci suggère que cibler les mitochondries défectueuses induit une protection en ciblant spécifiquement la production d'ERO au niveau mitochondrial.



**Figure 22** : Exemples de peptides SS ciblant la mitochondrie (Szeto et., 2006).



**Figure 23** : Mécanisme d'action des peptides SS (Adaptée de Broome et al., 2008).

### 2.3. Découplage mitochondrial

Le découplage modéré de la chaîne respiratoire mitochondriale peut également permettre de diminuer la production d'EROmt. En effet, il est bien connu que la production de EROmt est positivement corrélée à une augmentation du  $\Delta\Psi_m$ . Le découplage mitochondrial est un processus physiologique par lequel la fuite de protons à travers l'IMM permet aux protons de contourner le complexe V (ATP synthase) inhibant ainsi la synthèse d'ATP. Ce processus est régulé par des protéines de découplage (uncoupling protein : UCP) présentes au niveau de la membrane interne mitochondriale. Le découplage mitochondrial peut également être induit chimiquement par l'ajout de protonophores, comme le 2,4-dinitrophénol (DNP), le carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxyphényl hydrazone (FCCP) et le cyanure de carbonyle m-chlorophényl hydrazone (CCCP). La diminution de la production d'ERO a été reportée suite à l'utilisation d'agents découplants (Shabalina and J, 2011). Il a également été démontré que la transfection de la protéine UCP1 dans une lignée cellulaire de cardiomyocytes permet de protéger les cellules d'une hypoxie-réoxygénation (Bienengraeber et al., 2003) et que sa surexpression dans un modèle murin transgénique diminue les lésions liées à l'IR (Hoerter et al., 2004). L'inactivation du gène codant pour la protéine UCP3 augmente la taille de la zone infarctée chez la souris et cet effet est lié à une augmentation de la production d'ERO (Ozcan et al., 2013).

## IV. La mitochondrie : cible de la cardioprotection induite par l'exercice

Il est aujourd'hui très largement admis que la pratique régulière d'un exercice physique (entraînement) représente une stratégie thérapeutique efficace permettant de préserver l'intégrité du muscle cardiaque lors d'un phénomène d'IR (Powers et al., 2008). En effet, les bénéfices d'une telle pratique sur la santé cardiovasculaire ont été largement décrits (Ignarro et al., 2007) et la pratique d'une activité physique régulière fait aujourd'hui partie intégrante des recommandations de l'organisation mondiale de la santé. A 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 antioxydant myocardique (French et al., 2008; Hamilton et al., 2003; Powers et al., 1998) et du maintien de l'homéostasie calcique cellulaire au cours de l'IR (French et al., 2008; Wisløff et al., 2002). Lors de l'IR, les mitochondries sont reconnues comme étant des acteurs essentiels de la mort et de la survie cellulaire, néanmoins l'impact de l'exercice physique sur la sensibilité des mitochondries à l'IR, n'a été que très peu étudié et les mécanismes cellulaires sous-jacents aboutissant à leur protection demeurent non élucidés. Dans ce contexte, au cours de mon travail de doctorat, j'ai été amené à écrire une revue de littérature sur le sujet, intitulée : « Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury : a central role for mitochondria ? », publiée dans « Free Radical Biology and Medicine » en 2020 (Boulghobra et al., 2020a). Afin de ne pas être redondante dans mes propos vous trouverez ci-dessous la revue publiée.

# 1. Revue de littérature publiée

Free Radical Biology and Medicine 152 (2020) 395–410



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

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



## Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria?

Doria Boulghobra<sup>a</sup>, Florence Coste<sup>a</sup>, Bernard Geny<sup>b</sup>, Cyril Reboul<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> LAPEC EA4278, Avignon Université, F-84000, Avignon, France

<sup>b</sup> EA3072, «Mitochondrie, Stress Oxydant, et Protection Musculaire», Université de Strasbourg, 67000, Strasbourg, France



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Physical activity  
Mitochondria  
Metabolism  
Oxidative stress  
Ischemia-reperfusion

### ABSTRACT

Ischemic heart disease is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Physical exercise is an effective lifestyle intervention to reduce the risk factors for cardiovascular disease and also to improve cardiac function and survival in patients with ischemic heart disease. Among the strategies that contribute to reduce heart damages during ischemia and reperfusion, regular physical exercise is efficient both in rodent experimental models and in humans. However, the cellular and molecular mechanisms of the cardioprotective effects of exercise remain unclear. During ischemia and reperfusion, mitochondria are crucial players in cell death, but also in cell survival. Although exercise training can influence mitochondrial function, the consequences on heart sensitivity to ischemic insults remain elusive. In this review, we describe the effects of physical activity on cardiac mitochondria and their potential key role in exercise-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion damage. Based on recent scientific data, we discuss the role of different pathways that might help to explain why mitochondria are a key target of exercise-induced cardioprotection.

### 1. Introduction

Cardiovascular disease, including ischemic heart disease, is the first cause of morbidity and mortality worldwide [1]. Physical exercise is an effective lifestyle intervention for reducing cardiovascular disease risk factors, and for improving cardiac function and survival in patients with ischemic heart disease [2–4]. Moreover, among the strategies for reducing heart damage during ischemia and reperfusion (IR), regular physical exercise is efficient in rodent experimental models [5] and also in humans [6]. However, the cellular and molecular mechanisms of the cardioprotective effects of exercise remain unclear, although their unraveling could help to identify new strategies and new therapeutic targets to reduce heart vulnerability to IR injuries.

Mitochondria are under the spotlight as a key trigger of post-ischemic reperfusion injuries. Indeed, in severe myocardial ischemia, damage to the mitochondrial electron transport chain occurs mainly during the ischemic period. Post-ischemic reperfusion of tissues that contain ischemia-damaged mitochondria leads to mitochondrial dysfunction-driven injuries due to excessive reactive oxygen species (ROS) production and calcium dysregulation. This results in mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, followed by membrane permeation, swelling, disruption of mitochondria, and release of proapoptotic factors [7].

Over the last decade, several studies have demonstrated that changes in mitochondrial function are key steps in the exercise benefits on cardiac function. Overall, exercise training improves cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation [8,9], promotes mitochondrial clearance of ROS, and increases mitochondria number, size and clearance [10,11] in the heart. Thus, exercise-induced cardioprotection from IR injury might be mainly explained by the improvement of the myocardial antioxidant status and calcium homeostasis [12,13].

Although the effect of physical exercise on mitochondria are evident in healthy and pathological heart, its role in exercise-induced cardiac pre-conditioning and in the subsequent limitation of IR injuries is less obvious. In this review, we focus on the effects of physical activity on cardiac mitochondria and on its potential key role in exercise-induced cardioprotection during IR.

### 2. Mitochondria in cardiac ischemia/reperfusion injuries

Mitochondria are important intracellular organelles present in all eukaryotic cells. Due to their key roles in energy production and regulation of cell stress pathways, mitochondria are central targets for understanding tissue injury, particularly in the heart during IR. The role of mitochondria in IR injuries has been extensively reviewed [14–16]. In this section, we summarize some key concepts that will be used in

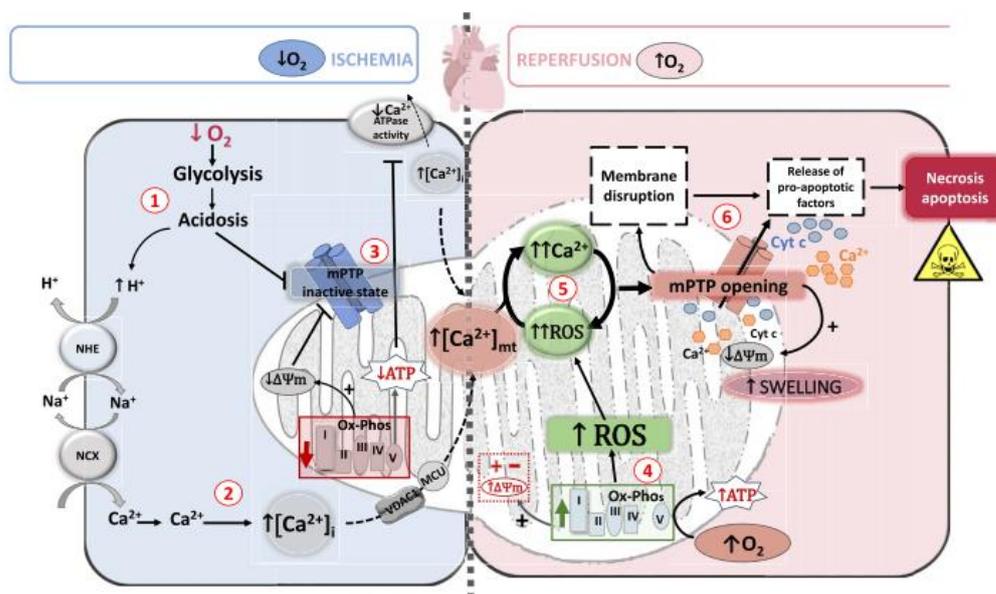
\* Corresponding author. Cardiovascular Physiology Laboratory – EA4278, Faculty of Sciences, Avignon Université, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France.  
E-mail address: [cyril.reboul@univ-avignon.fr](mailto:cyril.reboul@univ-avignon.fr) (C. Reboul).

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.005>

Received 10 February 2020; Received in revised form 1 April 2020; Accepted 7 April 2020

Available online 12 April 2020

0891-5849/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



**Fig. 1.** Cardiac mitochondria in ischemia and reperfusion injury.

During myocardial ischemia, the restriction in  $O_2$  supply inhibits oxidative phosphorylation (OX-PHOS) and switches the cell energetic metabolism to anaerobic glycolysis, resulting in lactic acid accumulation and intracellular acidosis (1). Consequently, pH decreases and cell functions are impaired.  $Na^+ / H^+$  exchanger (NHE) extrudes  $H^+$ , leading to intracellular  $Na^+$  overload. Excess  $Na^+$  is exported via the activation of the  $2Na^+ / Ca^{2+}$  exchanger (NCX) in reverse mode. This results in cytosolic  $Ca^{2+}$  overload (2). As ATP is progressively depleted during ischemia, ion pumps cannot function properly and this contributes to exacerbate the intracellular  $Ca^{2+}$  increase. The rise in  $Ca^{2+}$  during ischemia and reperfusion leads to mitochondrial  $Ca^{2+}$  accumulation. OX-PHOS inhibition is the primary cause of low ATP production and is associated with low mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Both acidic pH and low mitochondrial potential contribute to maintain the mPTP channels in the closed state during ischemia (3).

During reperfusion, the rapid re-establishment of OX-PHOS and  $\Delta\Psi_m$  associated with mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload results in a strong rise in reactive oxygen species (ROS) production in mitochondria (4). A complex interplay between ROS production and  $Ca^{2+}$  overload triggers mPTP opening (5), leading to  $\Delta\Psi_m$  collapse, mitochondrial respiration inhibition, mitochondrial swelling and disruption, and cell death (6).

MCU, mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter; mPTP, mitochondrial permeability transition pore.

our review.

### 2.1. Mitochondrial structure and function in the heart

The mitochondrion structure in physiological conditions has been well characterized and reviewed [17,18]. Cardiomyocytes contain two types of mitochondria: subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar (IFM) mitochondria that can be differentiated on the basis of their location, morphology, and functions (respiratory and calcium retention capacity). IFM are located between parallel bundles of myofibrils close to the sarcoplasmic reticulum (SR)  $Ca^{2+}$  release sites. They are relatively uniform in size and shape (mostly tubular) [19]. On the other hand, SSM are observed immediately below the sarcolemma and are more variable in shape and size (mostly lamelliform) than IFM. Shape differences can be important because mitochondrial morphology and function are correlated. Moreover, Boengler et al [20] reported that in cardiomyocytes, connexin 43, also known as gap junction  $\alpha$  protein 1 (GJA1), is only present at the inner membrane of SSM. This could contribute to explain the functional differences between SSM and IFM because several studies indicate that mitochondrial connexin 43 modulates mitochondrial respiration at complex I of the electron transport chain, oxygen consumption, ROS production, and adenosine triphosphate (ATP) synthesis [21–24].

In adult cardiomyocytes, mitochondria produce 90% of ATP and occupy 30% of the cell volume. As the heart is continuously contracting in a rhythmic manner, it needs a fast and effective intracellular energy source to match the cardiomyocyte high energy demands [25,26]. Besides their critical role in energy production, mitochondria are also involved in other key cellular processes, such as  $Ca^{2+}$  homeostasis, free

radical production and cell death. Therefore, mitochondria are key players during normal and pathological heart function.

Mitochondria generate cellular energy in the form of ATP through oxidative phosphorylation (OX-PHOS). Briefly, mitochondria import substrates from the cytosol and use them to fuel the tricarboxylic acid (TCA) cycle, leading to the production of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and reduced flavin adenine dinucleotide ( $FADH_2$ ) for oxidation by the electron transport chain (ETC). ETC contribute to generate the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and the pH gradient ( $\Delta pH_m$ ) used to drive ATP synthesis by ATP synthase (also known as complex V). Approximately 60–70% of all produced ATP supports cardiac contraction, and the remaining 30–40% supports the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) and other ion pumps [27].

As previously reviewed [28], mitochondria are also the site of other important processes. Particularly, the regulation of cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis affects many other cell signaling pathways, free radical production, and cell death. When cardiac workload is increased, higher intracellular  $Ca^{2+}$  level contributes to the regulation of cardiac excitation-contraction coupling, and also to the fine balance between mitochondrial function and dysfunction. Indeed, mitochondria can remove  $Ca^{2+}$  from the cytosol through the mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter (MCU), a highly selective  $Ca^{2+}$  channel. Increased  $Ca^{2+}$  level in the mitochondrial matrix stimulates oxidative phosphorylation (OX-PHOS) by activating dehydrogenases of the TCA cycle [29,30], ATP synthase, and adenine nucleotide translocator [29]. However, excessive  $Ca^{2+}$  can become a pathological stimulus, resulting in ROS overproduction, loss of  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial swelling, cytochrome C release, and apoptosis [31].

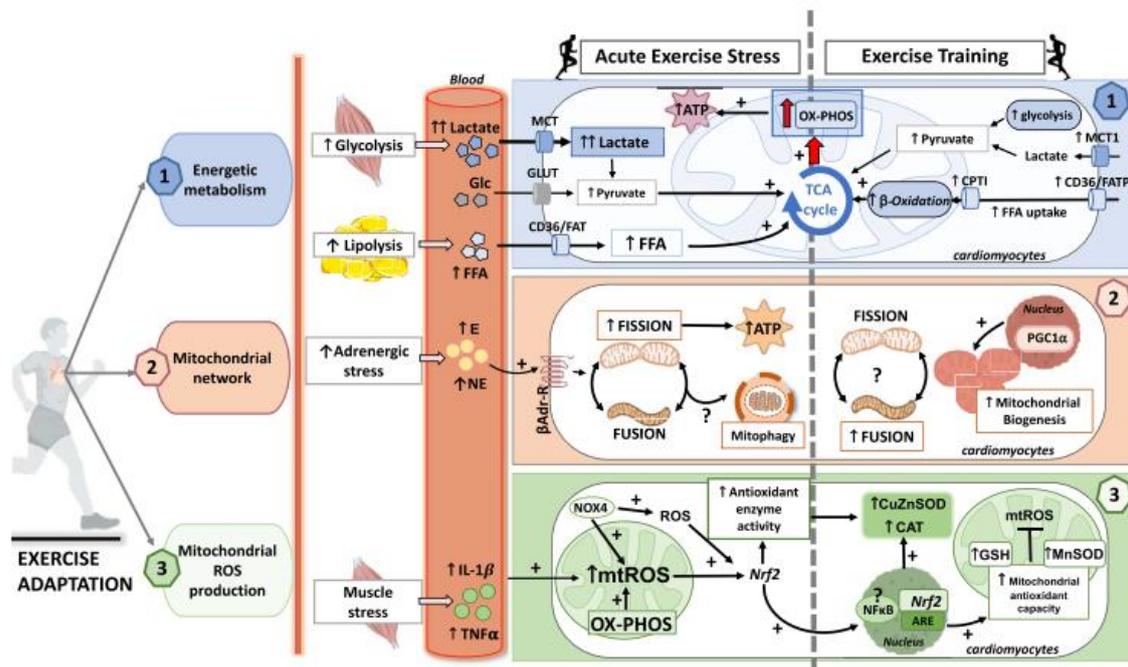


Fig. 2. Effect of acute exercise and exercise training on cardiac mitochondria.

Acute exercise results in an abrupt increase in glucose uptake and oxidation. Increased AMPK activation in response to exercise contributes to promote glucose uptake during physical activity. In the case of moderate and prolonged exercise, adipose tissue lipolysis and muscles glycolysis increase the circulating levels of fatty acids and lactate which are used by the heart to respond to increased energy demands (1). Recently, it has been shown that adrenergic and metabolic stress in response to exercise also results in cardiac mitochondrial fragmentation that contributes to the metabolic response upon increased cardiac workload. In addition, acute exercise might have a positive effect on mitophagy to eliminate impaired organelles (2). Acute exercise also increases the circulating level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as well as cardiac cytosolic and mitochondrial ROS production (3). These elements contribute to the normal heart response to exercise and constitute the key triggers of cardiac adaptations to exercise training. Indeed, exercise training increases the activity of enzymatic antioxidant defenses through ROS-dependent activation of *Nrf2* (3). Exercise training improves the cardiac response to high-energy expenditure. Several adaptations of cardiac metabolic pathways contribute to increase ATP production by the heart during stress situations. For instance, exercise training increases the levels of CD36, fatty acid transport protein 1 (FATP1) and carnitine palmitoyl-transferase I (CPT1). This contribute to improve free fatty acid (FFA) uptake and to increase the  $\beta$ -oxidation. Moreover, exercise training is associated with higher level of the lactate transporter MCT1 and of glycolysis. Although only few data are available, exercise training might also influence the mitochondrial network via i) its positive effect on mitochondrial fusion, and ii) its ability to increase mitochondrial biogenesis through PGC1 $\alpha$  activation. (2). Finally, *Nrf2* activation in response to exercise (*Nrf2*-ARE) contribute to reduce mitochondrial ROS (mtROS) production by increasing antioxidant capacity (3).

E, epinephrine; NE, Norepinephrine; SOD, superoxide dismutase; GSH, reduced glutathione; CAT, catalase; *Nrf2*, nuclear factor erythroid-2-related factor 2; *NFkB*, nuclear factor kappa B; OX-PHOS, oxidative phosphorylation; MCT1, Monocarboxylate transporter 1; GLUT, Glucose transporter; PGC1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1; NOX-4, NADPH Oxidase 4.

As largely reviewed [32], mitochondria are also the main intracellular source of ROS that are continually generated as by-products of the electron transport chain. Thanks to an efficient enzymatic antioxidant system, in physiological conditions, ROS production is restricted to subcellular sites [33] and can participate in redox signaling [16,34]. However, in some conditions, dysfunction of the respiratory chain can result in a strong increase in ROS production. Within a specific concentration range, ROS can induce the cell stress response and activate apoptosis by increasing the mitochondrial membrane permeability transition and/or by modulating pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl2 family [35].

## 2.2. Mitochondria, a key trigger of cardiac ischemia/reperfusion injuries

As heart function is strictly dependent on aerobic metabolism, cardiac cells are highly vulnerable to depletion of O<sub>2</sub> and substrates. This can affect also mitochondrial function. As mentioned above, mitochondria are able to control both cell death and several aspects of cell survival. Although the function of mitochondria in IR injuries has been previously reviewed [36–38], in this section we summarize their central role during IR (Fig. 1).

It is now widely accepted that cell death, which occurs during post-ischemic reperfusion, is strongly mediated by mPTP activation that

contribute not only to the cell bioenergetics defects, but also to membrane disruption and release of pro-apoptotic factors [7]. During reperfusion, mPTP activation is triggered by a complex interplay between ROS production and Ca<sup>2+</sup> overload [38,39] (Fig. 1, point 5). Indeed, excessive mitochondrial Ca<sup>2+</sup> accumulation strongly increases the risk of mPTP activation, leading to  $\Delta\Psi_m$  collapse, mitochondrial respiration inhibition, and cell death [41]. Activation of mPTP is also facilitated by increased production of mitochondrial matrix ROS [39] (Fig. 1, point 4). The interplay between these factors appears complex because increased mitochondrial matrix [Ca<sup>2+</sup>] is associated with increased ROS production during reperfusion and ROS influences the function of a variety of Ca<sup>2+</sup> channels, pumps and exchangers [39]. In addition,  $\Delta\Psi_m$  collapse also contributes to increase mitochondrial ROS production in a “ROS-induced ROS release” manner [42]. It is now proposed that reverse electron transport at the level of complex I is a unifying mechanism to explain excessive ROS production during early reperfusion [15]. Indeed, Chouchani et al [43] reported that during ischemia, in absence of oxygen, succinate stores electrons. During reperfusion, succinate is rapidly re-oxidized by succinate dehydrogenase, resulting in a reverse electron transport at mitochondrial complex I [43]. Interestingly, complex I inhibition with rotenone limit ROS, oxidative damage and IR injuries [44] and inhibition of succinate accumulation during ischemia with dimethyl malonate reduced ROS production upon

reperfusion [43].

During IR, mitochondria are critical for cell death, but also for cell survival. Indeed, most survival signaling pathways converge to mitochondria. It is now well established that ischemic conditioning protects the heart from IR through the activation of the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK) and Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) signal transduction pathways. Interestingly, these signaling pathways converge to mitochondria where they inhibit mPTP activation [45]. Therefore, targeting mPTP activation during reperfusion is a relevant strategy for heart protection. In mice, pharmacological inhibition or genetic ablation of cyclophilin D prevents mPTP activation during IR, and results in reduced infarction size [46]. Moreover, cyclosporine A, an immunosuppressive agent, blocks mPTP activation by binding to cyclophilin D [47,48]. This strategy shown very promising results in different experimental models, but failed to reduce the probability of death or heart failure in patients treated with cyclosporine A before percutaneous coronary interventions [49]. This result clearly emphasizes the need of more research to decipher the mechanisms of IR and cardioprotection.

### 3. Cardiac mitochondrial adaptations to exercise training

The energetic impact of exercise training and its consequence on mitochondrial and metabolic processes have been previously reviewed [50–52]. As these adaptations contribute to explain the potential key role of mitochondria in exercise-induced cardioprotection, we summarize here the major effects of exercise training on cardiac mitochondria (Fig. 2).

The heart has high energy demands because of its rhythmic contraction. During exercise, the heart energy expenditure strongly increases. To adapt the heart metabolism to the increased workload and higher energy expenditure, mitochondrial ATP production is increased. Indeed, mitochondria occupy more than 30% of the cardiomyocyte volume and produce more than 30 kg of ATP per day [53]. The metabolic phenotype of an exercise-trained heart is different from that of a sedentary heart. A trained heart is characterized by enhanced fatty acid and glucose oxidation and lower glycolysis rates [54]. Its higher ability to adapt its metabolism to acute stress is explained by increased expression of AMPK, peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1 (PGC-1 $\alpha$ ) and PI $_3$ K to promote fatty acid and glucose oxidation, glucose uptake, and mitochondrial biogenesis [55–58]. Acute exercise is also associated with increased ROS production in the heart, especially as electron transport chain by-products. Elevated ROS level is deleterious for the heart. Conversely, “physiological” ROS production is considered to be a trigger of the heart adaptations to exercise.

#### 3.1. The impact of exercise training on energetic metabolism

Considering the ability of the heart to use multiple substrates, it is classically termed as a “metabolic omnivore”. Indeed, different energy substrates, such as fatty acids, carbohydrates, ketones and amino acid, contribute to meet the high energy demand of the heart. At rest, fatty acid oxidation is the biggest contributor to ATP production (~40–60%) while carbohydrates metabolism generates the remainder (~20–40%). During exercise, adipose tissue lipolysis and muscles glycolysis increase the circulating levels of fatty acids and lactate which are used by the heart to respond to increased energy demands [51,59] (Fig. 2, point 1). Increased in circulating lactate especially is considered as a key element of cardiac response to exercise, since 1) during exercise its contribution to total oxidative metabolism become preponderant [51] and 2) lactate, as an anaplerotic substrate, is proposed to positively impact fatty acid oxidation in the heart [60]. Thus repetitive bouts of exercise (i.e. exercise training) leads to specific metabolism adaptations that may contribute to improve cardiac response to metabolic energetic stress. In skeletal muscle, the impact of exercise training on energetic metabolism is well described and has been extensively reviewed [61]. The effect on

cardiac muscle is less clear. In cardiac myocytes, mitochondrial density and cardiac workload seem to be highly correlated [62]. This suggests that exercise training increases mitochondrial biogenesis in the heart in healthy [63] and also pathological [11] conditions. However, only few studies investigated the effect of exercise training on mitochondrial density in healthy heart, with contradictory results (see section 2b: “Impact of exercise on mitochondrial network”). Exercise training also activates PPAR $\alpha$  that leads to an increase in the expression of genes encoding factors involved in cellular fatty acid oxidation, particularly fatty acid transport protein 1 (FATP1), carnitine palmitoyltransferase I (CPT1), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), and acyl carrier protein (ACP) [64,65]. As mentioned above, the use of lactate by the heart is increased in response to exercise. Interestingly, in the exercise trained heart, lactate transporter MCT1 expression is increased [66]. In addition, as every single exercise bout increases the [AMP]/[ATP] ratio, exercise training results in AMPK activation in the heart [67], thus influencing the activity of several key proteins involved in cardiac energetic metabolism. Specifically, AMPK promotes GLUT4 translocation to the cellular membrane, facilitating glucose uptake by cardiomyocytes, and increases glucose oxidation by increasing 6-phosphofructo-2-kinase (PFK2) activity [63,68,69].

Recently it has been reported, in skeletal muscle, that exercise training increases the expression of electron transport chain components in mitochondria and their assembly in super-complexes [70]. This is considered a novel adaptive mechanism of skeletal muscles to increased energy demands. In addition, muscle mitochondrial super-complexes assembly in response to exercise provide a minor production of ROS and lower mitochondrial oxidative damages [71]. However, no information is available on the myocardium.

When the effect of exercise training on myocardial bioenergetics is evaluated in beating heart using  $^{31}$ P nuclear magnetic resonance ( $^{31}$ P-NMR) spectroscopy, the results are not so obvious. For instance, studies on athletes [72] and exercise-trained rats [73], in which hearts from trained and sedentary individuals were compared, detected only few differences in high energy phosphate levels. Specifically, they found a trend toward lower phosphocreatine/ATP ratio in trained hearts; however, the net ATP synthesis flux was unchanged compared with sedentary hearts. Conversely, another study in which the heart of rats was challenged by increasing its workload reported that purine efflux is reduced in the heart of trained rats. This suggests that the myocardium metabolic status is improved by exercise training [74]. In this study, the authors also used  $^{31}$ P-NMR spectroscopy in isolated hearts and found that phosphocreatine and the phosphocreatine to ATP ratio were decreased, whereas creatine, AMP and ADP concentrations increased in trained hearts. Some discrepancies in the literature could be explained by the use of different exercise training strategies (swimming vs running) [75]. Altogether, it seems that in physiological conditions, exercise training results in subtle adaptive changes of myocardial energy production. However, these subtle adaptations could play a key role in the heart capacity to adapt its energetic response to stress. This point will be discussed below (section 3.a).

#### 3.2. The impact of exercise training on the mitochondrial network

Mitochondrial function is dependent on a highly dynamic and connected network of mitochondria that adapt their size and morphology. This dynamic network has a life cycle that includes mitochondrial biogenesis, rearrangements via fission-fusion, and mitophagy of damaged mitochondria. These processes are critical for proper mitochondrial functioning because alterations in the network capacity to adapt to changes in the cell environment are associated with impaired oxidative phosphorylation, and global metabolic dysfunction. Some works suggest that exercise can influence the cardiac mitochondrial network life cycle; however, data are limited and results are often contradictory.

In skeletal muscle, exercise training is well known to increase PGC-

1, a key regulator of mitochondrial biogenesis, and mitochondrial density [76,77]. In cardiac muscle, only few studies in rodents addressed the effects of exercise training on mitochondrial ultrastructure/density with controversial results [78,79]. Overall, it seems that exercise training increases mitochondrial biogenesis in the heart [63,78,80] (Fig. 2, point 2). However, a study in which swimming training [79] and indirect evidence of mitochondrial biogenesis (mitochondrial proteins per gram of ventricular tissue) were used did not detect any impact of exercise training in male and female rats, despite the development of cardiac hypertrophy.

Another key element of mitochondrial network rearrangements is the balance between mitochondrial fusion and fission. Mitochondrial fission is usually induced by pathological stress, such as ischemia, and is associated with dysfunctional mitochondria. However, it has been recently shown that inhibition of fission results in cardiac dysfunction [81]. This suggests that fission also plays a key role in the normal cardiac response to stress. In rat skeletal muscle, acute exercise (90 min) increases the level of two regulators of mitochondrial fission, *Fis1* (a gene encoding an outer mitochondrial membrane protein bound to dynamin-1-like protein, DRP1, a docking protein) and *Dnm1L* (the gene encoding DRP1) [82] (Fig. 2, point 2). This is not so evident, since Huertas et al [83] reported that acute exercise in athletes results in skeletal muscle mitochondrial fusion. After 30 days of exercise training, the gene expression levels of mitochondrial fission regulators were reduced, whereas the expression levels of mitochondrial fusion genes were increased [82] (Fig. 2, point 2). In line with some results obtained on skeletal muscle, mitochondrial fission is reported as a normal response of the heart to increased energy demand and is dependent on  $\beta$ 1-adrenergic receptors stimulation [81]. However, no clear evidence exists concerning the impact of exercise training on the cardiac mitochondrial network. In healthy cardiac muscle, 8 weeks of exercise training increased the number of and decreased the size of mitochondria in the heart [80,84]. Conversely, Ghahremani et al. [85], found that after IR, expression of mitofusin 1 (*Mfn1*) and 2 (*Mfn2*), two genes encoding proteins involved in mitochondrial fusion, was increased and that of *Drp1*, a key regulator of mitochondrial fission, was decreased in exercise-trained rats compared with sedentary controls [85]. Additional studies are clearly needed to clarify the impact of exercise (acute or training) on the mitochondrial fusion/fission balance and its role in the cardiac response to exercise.

Also the results on mitophagy after exercise are contradictory. Li et al. [86] reported that mitophagy-related proteins are significantly upregulated during the early stages of acute exercise and recovery. However, Coronado et al. [81] found that after acute exercise, the mitophagy proteins Parkin and PINK1 are decreased in mitochondrial fractions. Thus, mitophagy might also contribute to the rearrangement of the mitochondrial network in response to cardiac stress; however, the effect of acute exercise is not clear, and that of exercise training has not been clearly investigated, to the best of our knowledge. Thus, additional studies are needed to improve our knowledge and understanding of the effects of acute and chronic exercise on the mitochondrial network. Whether this phenomenon might contribute to exercise-induced cardioprotection will be discussed below (section 3.e).

### 3.3. Impact of exercise training on mitochondrial ROS production and antioxidant defenses

The impact of exercise training on ROS production and antioxidant defenses has been extensively reviewed [87,88]. Here, the available data in cardiac mitochondria are summarized (Fig. 2, point 3).

In the heart, exercise-induced mechanical and metabolic stress promotes the production of ROS and reactive nitrogen species (RNS) [89,90]. It is thought that this ROS/RNS burst in response to a single bout of exercise triggers many of the adaptive processes observed in response to repeated exercise (i.e. exercise training). Indeed, when exercise training is associated with antioxidant intake, the beneficial

effects of exercise training on cardiac muscles are lost [91]. As previously reviewed [88], the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*), which is a strong regulator of antioxidant enzymes and cellular stress resistance, is a key trigger of molecular adaptations to exercise. While ROS was initially considered a potent damaging molecule, it is now clear that it also plays an important role in cell signaling. A single exercise bout is sufficient to increase *Nrf2* gene expression in cardiac [92] muscles. Muthusamy et al. [92] reported that exercise-induced *Nrf2* Antioxidant Response Element (ARE) is abolished in *Nrf2* KO mice, whereas ROS level after acute exercise is comparable in wild type and *Nrf2* KO mice. As a result, the exercise-induced increase in SOD1, SOD2, catalase and GPx level is not observed in *Nrf2* KO mice [92]. Thus, in myocardium, mitochondrial glutathione (GSH) and MnSOD as well as cytosolic CuZnSOD and catalase are increased by exercise in an *Nrf2*-dependent manner [89,92]. This phenomenon is reported to contribute to exercise-induced cardioprotection [87,95]. *Nrf2* activation in the heart in response to acute exercise has been related to NOX4-dependent ROS [96]. Considering that NOX4 has been shown to localize also in mitochondria, especially in the heart [97], Kasai et al [98] proposed that mitochondrial NOX4 is a key trigger of *Nrf2* activation in response to exercise. Interestingly, the essential role of *Nrf2*-ARE observed in the heart of animal models was confirmed on human skeletal muscles [99] and correlates with the level of mitochondrial  $H_2O_2$  [94]. This contribute to reduce mitochondrial ROS production, without any effect on respiration [100]. Increased level of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in response to exercise also contribute to the adaptive antioxidant response of the heart. Indeed, the administration of the neutralizing antibodies targeting those cytokines abolished the activation of Mn-SOD in response to a single boot of exercise [101]. Interestingly, injection of TNF- $\alpha$  can mimic the response to exercise and the use of an antioxidant (MPG) before the exercise session blunt the adaptive response to exercise. In skeletal muscles, the activation of the nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) in response to exercise is well described and proposed to be a key trigger of training adaptations, such as antioxidant enzyme [102] or NOS [103] induction. In the heart, its role is less evident. Acute exercise activates myocardial NF $\kappa$ B in rats [104], whereas 6 weeks of exercise training decrease the cardiac level of NF $\kappa$ B and increase the level of I $\kappa$ B, known as a protein that keeps NF $\kappa$ B in an inactive state [105].

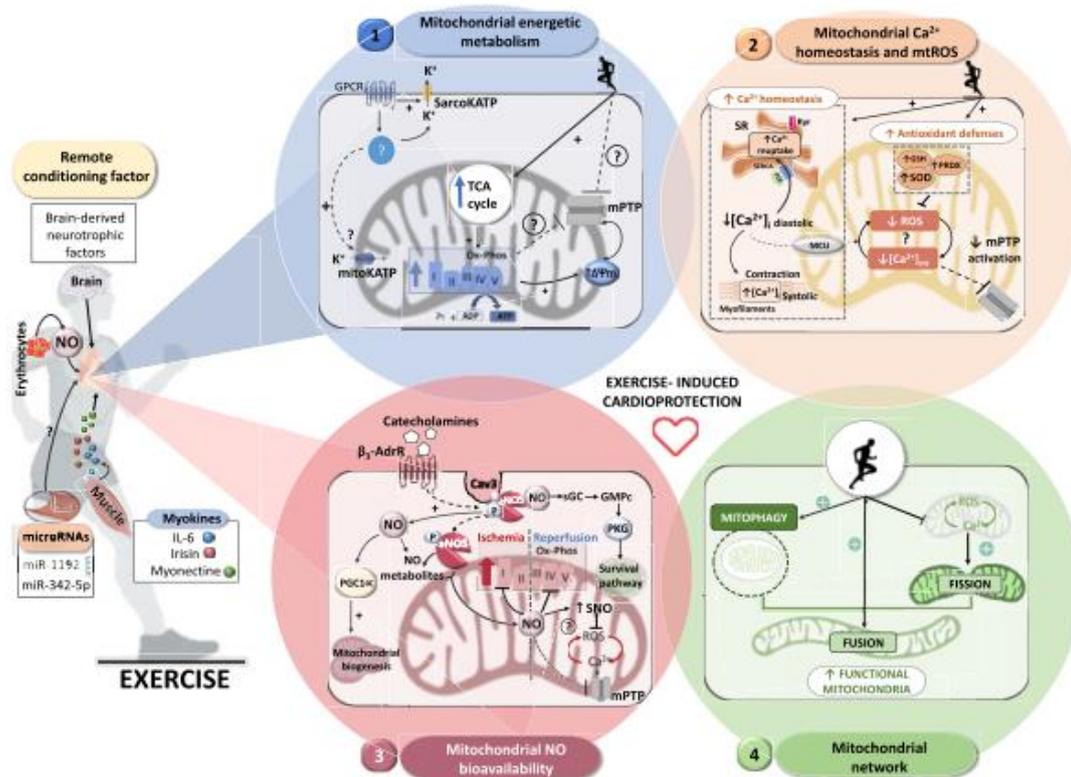
Altogether, it is clear that ROS production during a single boot of exercise triggers an *Nrf2*-dependent or -independent antioxidant response that, when the exercise is repeated (i.e. exercise-training), certainly contributes to increase the cardiac muscle capacity to cope with deleterious oxidative stress. This point will be discussed below (section 3.b).

### 4. Mitochondria and exercise-induced cardioprotection: potential pathways and mechanisms

Clearly, exercise training can influence mitochondrial function and response to acute stress. Consequently, mitochondrial adaptations to exercise training should constitute a key feature of exercise-induced cardioprotection. However, the underlying mechanisms remain unclear. In this paragraph, several pathways and mechanisms that could explain how mitochondria contribute exercise-induced cardioprotection will be described (Fig. 3).

#### 4.1. Energetic metabolism and mitochondrial respiration

During ischemia, decreased ATP levels disrupt the activity of key pump proteins that control ion homeostasis in cardiac cells. This results in  $Ca^{2+}$  overload that contributes to altering cardiomyocyte homeostasis and to increasing ROS production, calpain activation, contractile impairment, and ultimately cell death. During post-ischemic reperfusion, ATP synthesis recovery is essential to restore cardiac homeostasis and function.



**Fig. 3. Potential pathways of exercise-induced cardioprotection.**

The mechanisms of exercise-induced cardioprotection need to be thoroughly investigated, but several pathways have been already implicated in reducing the heart sensitivity to ischemia-reperfusion. First, exercise training is a stressful situation for many organs, including heart and muscle. This leads to the production of several exerkines (mainly from muscles, but also brain, red blood cells, and other tissues) that contribute to the heart remote conditioning. In the heart, remote or direct conditioning can be explained by.

(1) Exercise training influences cardiac metabolic processes and improves the cardiac response to stressful situations. One could hypothesize that the higher ability of trained heart to maintain energy homeostasis during post-ischemic reperfusion might contribute to maintain  $\Delta\Psi_m$  and to limit mPTP activation. This could also promote F1F0-ATP synthase activity to sustain ATP synthesis during reperfusion. In addition, activation of sarcolemma (sarcoKATP) and/or mitochondrial (mitoKATP) channels by exercise induces cellular and/or mitochondrial hyperpolarization and then protects mitochondria and myocardium during ischemia-reperfusion.

(2) The regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration, especially during IR, could constitute another key trigger of exercise-induced cardioprotection. Exercise influences the ability of cardiac cells to regulate calcium homeostasis and to protect key calcium handling proteins (SERCA) during IR. As mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload is a key trigger of ROS production and mPTP activation, the ability of the exercise-trained heart to regulate calcium homeostasis even during IR could limit mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and thus cell death. In addition, some results suggest that in exercise-trained heart, mitochondria are less sensitive to increased Ca<sup>2+</sup> load with delayed mPTP activation. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentration is intricately related to mitochondrial ROS production. The capacity of mitochondria of exercise-trained hearts to scavenge ROS during IR has been largely studied and reviewed. It is now acknowledged that exercise training improves mitochondrial antioxidant enzyme activity that contributes to exercise-induced cardioprotection.

(3) Given the key role of eNOS in exercise-induced cardioprotection, we propose that exercise increases NO bioavailability close to mitochondria, contributing to exercise-induced cardioprotection. NO cardioprotective effects might be mediated i) indirectly through the activation of the cGMP-PKG pathway and of downstream survival signaling cascades that converge to mitochondria, and/or ii) through direct protein S-nitrosylation (SNO) of different mitochondrial targets implicated in ROS production (complex I of the electron transport chain, for example) or in mitochondrial swelling (cyclophilin D, for example). Mitochondrial biogenesis in response to exercise training also is dependent on the eNOS-NO pathway.

(4) Finally, as exercise training seems an efficient strategy to blunt the complex vicious interplay between ROS and Ca<sup>2+</sup> overloading during IR, one can hypothesize that exercise training can also influence mitochondrial dynamics during IR by preventing mitochondrial fission and promoting mitochondrial fusion. Exercise training also promotes mitophagy of impaired mitochondria, which could also contribute to limit mitochondrial-dependent stress during IR. These effects of exercise training on mitochondrial dynamics certainly help to maintain the pool of functional and less vulnerable mitochondria during IR.

mPTP, mitochondrial permeability transition pore; IR, ischemia reperfusion; MCU, mitochondrial calcium uniporter; NO, nitric oxide; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; PKG, protein kinase G; GPCR, G protein-coupled receptors.

As discussed above (section 2.a), exercise induces the expression of mitochondrial respiratory chain/TCA cycle proteins, and also of mitochondrial creatine kinase [106]. This enhances mitochondrial oxidative capacity both quantitatively and qualitatively, and could contribute to maintain the energy homeostasis during IR insults [107] and to improve the heart functional recovery and ion homeostasis. There is no clear evidence of a direct link between the integrity of mitochondrial

bioenergetics and exercise-induced cardioprotection, as previously reviewed and discussed [87]. Alleman et al [108] reported that the recovery of mitochondrial energetics (rate of O<sub>2</sub> consumption) after anoxia/reoxygenation is improved in exercised animals compared with sedentary controls. The authors also showed that the mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production to O<sub>2</sub> consumption ratio was 2-fold higher in mitochondria from sedentary than exercised animals. This strongly

suggests that exercise training results in lower ROS production relative to  $O_2$  consumption. In agreement, it has been shown that exercise training limits the alteration of the respiratory control ratio in mitochondria exposed to anoxia-reoxygenation *in vitro* [109]. Tao et al [110] reported that in mice, ischemia is associated with down-regulation (mRNA and protein levels) of enzymes involved in fatty acid metabolism and also of PPAR- $\alpha$  and PPAR- $\gamma$ . The same authors also showed that glucose transporter 1 (*Glut-1*) and glycogen synthase 1 (*Gsy1*) were significantly induced in ischemic hearts, without changes in *Glut-4* mRNA level. Interestingly, all these changes were blunted in the heart of exercise-trained mice and were associated with increased mitochondrial biogenesis following acute myocardial infarction. These results could contribute to explain the higher recovery of mitochondrial energetics during reperfusion. Therefore, it seems that increased mitochondrial biogenesis and coupling, together with a preserved  $\beta$ -oxidation, might help cardiac cells to cope with IR.

Mitochondrial PTP opening during reperfusion also can contribute to alter ATP synthesis recovery during reperfusion. Indeed, in condition of  $\Delta\Psi_m$  loss, the F1FO-ATP synthase actively hydrolyzes rather than synthesizes ATP, leading to cell death [111,112]. Yet, the beneficial impact of exercise on mPTP activation remains controversial [113]. In some studies, exercise could limit mPTP activation during IR [114,115], with subsequent beneficial effects on  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial energetics, and reperfusion arrhythmias [108]. How exercise training can blunt mPTP activation remains unknown, and needs further investigation. Some hypotheses are discussed below.

Among the channels affected by the change in ATP levels during IR, the ATP-sensitive potassium channels are well described. These energy-sensing channels, present in the sarcolemma (sarcoK<sub>ATP</sub>) and in mitochondria (mitoK<sub>ATP</sub>) of cardiac myocytes, are important regulators of cardiac myocyte function. SarcoK<sub>ATP</sub> or mitoK<sub>ATP</sub> channel opening before an IR insult confers cardioprotection [116]. The activation of sarcoK<sub>ATP</sub> channels by a conditioning strategy can shorten the cardiac action potential duration, and then protect the myocardium. Their activation can also trigger the opening of mitoK<sub>ATP</sub> channels, with subsequent protection of mitochondria during IR [117]. As previously reviewed [87], sarcoK<sub>ATP</sub> channels contribute to exercise-induced cardioprotection [118], whereas the role of mitoK<sub>ATP</sub> channels needs to be better investigated.

#### 4.2. ROS production and antioxidant defenses

During the first few minutes of reperfusion, the initial damaging event is a ROS burst, including mitochondrial ROS [119,120]. It is thought that superoxide is generated mainly in complex I and III, and to a lesser extent in complex II [121] of the mitochondrial electron transport chain and that it can directly cause oxidative damage [43,122]. It can also act through the formation of  $H_2O_2$  and other damaging species. Increased ROS production contributes to mPTP opening, resulting in apoptosis. In addition, ROS-mediated mitochondrial damage results in the release of DAMPs and in the oxidation of protein, DNA and lipids. Mitochondrial damage can trigger intrinsic and extrinsic cell death pathways, thereby contributing to IR injuries [123].

In this context, it seems important to limit mitochondrial ROS production during the first few minutes of reperfusion and to blunt the subsequent pathological cascade. As mitochondrial oxidative stress is the major contributor of IR injury, many studies have investigated the effectiveness of antioxidant strategies [124,125]. Conventional antioxidants have limited effects. In contrast, mitochondria-targeted antioxidants, such as MitoQ, attenuate heart dysfunction and mitochondrial damage after IR in rats [126], and could represent a promising strategy.

It is acknowledged that the increased antioxidant capacity after physical exercise contribute to reduce myocardial injury during IR [13,87,127]. Exercise training results in reduced mitochondrial oxidant production and improved mitochondrial antioxidant enzyme activity

(MnSOD, CuZnSOD and GPx) (Fig. 3, point 2). This is associated with protection of cardiac SSM and IFM from IR-induced alteration in OX-PHOS and oxidative damage [128]. Judge et al [129] reported that lifelong voluntary wheel activity decreased  $H_2O_2$  production in myocardial mitochondria of Fischer rats compared with their sedentary peers. The effect was comparable in SSM and IFM. Using a proteomic approach, Kavazis et al [130] confirmed that exercise training modulates both SSM and IFM and results in a cardioprotective phenotype [130]. They found that the level of monoamine oxidase, an important source of ROS, was reduced in IFM and SSM. In SSM, this was associated with an increase in the expression of the mitochondrial-specific  $H_2O_2$ -scavenging enzyme peroxiredoxin III. Among the antioxidant enzymes that are implicated in reducing cardiac injuries during IR, increased MnSOD activity is one of the main triggers of exercise beneficial effects [101,131,132]. In agreement, prevention of MnSOD increase in exercise-trained heart using an antisense oligodeoxyribonucleotide reduced, but did not completely abolish the ability of exercise to protect the heart [12]. This strongly suggests that MnSOD plays an important role, but that other cardioprotective mechanisms may be involved. The pool of mitochondrial GSH is another key element of the ROS detoxification system. Exercise training has no effect on the pool of total GSH and on the ratio of reduced to oxidized glutathione (GSH/GSSG) [129,133]. However, GSH replenishment after IR is improved in the heart of exercise-trained animals [133]. This is explained by the beneficial effect of exercise training on glutathione reductase activity [134]. Indeed, when glutathione reductase is inhibited with BCNU, exercise-induced cardioprotection is abolished. Moreover, in isolated cardiomyocytes, GSH recovery during reoxygenation correlates with the mitochondrial ability to maintain  $\Delta\Psi_m$  [108].

It is now well established that complex I is the major source of oxidative damage during IR. This complex is highly sensitive to IR [122]. Starnes and Olsen [113] demonstrated that 16 weeks of endurance exercise training reduces ROS production in cardiac mitochondria through specific adaptations of complex I, but does not improve mitochondrial tolerance to calcium overload. They found that rotenone, which blocks the complex I, abolishes the difference in  $H_2O_2$  production by mitochondria of exercised and sedentary hearts.

As mentioned above, ROS directly impact the integrity of several targets such as DNA, membranes and proteins, but can also contribute to the activation of redox signaling pathways involving posttranslational redox protein modifications. The balance between oxidized and reduced forms of signaling proteins is influenced by local generation of ROS and by the level of reductants such as glutathione. Such key proteins involved in the cardiac excitation contraction coupling, such as ryanodine receptors, sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase and Myosin Binding protein C, are well described to be redox sensitive [135] and impacted by redox changes in response to physical activity [136,137]. In addition, protein kinase A, which play a central role in the normal response of the heart to adrenergic stress, is also activated by ROS [138]. Its ROS-dependent overactivation contribute to cardiac dysfunction following myocardial infarction [139]. Mitochondria are especially at the center of redox processes. Indeed mitochondria generate ROS but also respond to ROS-mediated changes in cellular redox state. It has been established, notably using redox-proteomic approach, that many key proteins involved in mitochondrial function are sensitive to redox changes, such as cysteine oxidation, s-glutathionylation, s-nitrosylation, and acylation [140]. Such redox-post-translational modifications were reported to modulate mitochondrial ROS production. Indeed, as discussed below (section 3d. Nitric oxide bioavailability and mitochondria), s-nitrosylation of mitochondrial key proteins of the ETC contribute to protect the myocardium during IR [141,142]. Cyclophilin D is also sensitive to s-nitrosylation, which delays the activation of mPTP [143]. On the contrary, s-glutathionylation of complex I subunit is associated with increased mitochondrial ROS production [144]. Finally, deregulation of mitochondrial glutathionylation in the heart of Glutaredoxin-2 KO mice, reduced mitochondrial OX-PHOS and ATP

output [145]. Thus, despite redox regulations are certainly central in the response of the heart to exercise [146], their contributions in exercise-induced cardioprotection, especially at the level of the mitochondria, remain to be clarified.

Altogether, it seems that exercise training modulation of the mitochondrial redox state, of ROS production and of the sensitive equilibrium between ROS production and scavenging constitutes an important, but not the only trigger of cardioprotection (Fig. 3, point 2).

#### 4.3. Mitochondrial $\text{Ca}^{2+}$ homeostasis

During excitation-contraction coupling,  $\text{Ca}^{2+}$  transient triggers myofilament interaction and then sarcomere shortening, but also contributes to regulate mitochondrial function. The MCU channels allow the passage of calcium ions from the cytosol to mitochondria and contribute to regulate the subsequent equilibrium between cytosolic and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  level. Interestingly, calcium uptake by mitochondria is essential because at physiological levels, it can stimulate various metabolic processes, such as activation of mitochondrial dehydrogenases. At higher levels, calcium ions can be detrimental, by initiating cell death pathways (apoptosis and necrosis). The regulation of the cytosolic concentration of calcium ions, especially during IR, could constitute a key trigger of exercise-induced cardioprotection (Fig. 3, point 2).

To the best of our knowledge, no study has investigated the impact of exercise training on cardiac mitochondrial calcium uptake and MCU expression. In human skeletal muscles, 9 weeks of physical activity increases MCU level [147]. Considering the equilibrium between cytosolic and mitochondrial calcium concentration, one can hypothesize that the effect of exercise training on key calcium handling proteins could contribute to the regulation of mitochondrial calcium load. As previously reviewed [148,149], exercise training results in more effective coupling of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current to  $\text{RyR2}$   $\text{Ca}^{2+}$  release [150], and faster  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient decay that is partly explained by increased SERCA2a level [151]. Such effect of physical activity on key  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins could contribute to improve the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis during IR and to protect the heart. It has been reported that exercise training ability to increase the level of cardiac SERCA2a plays a key role in heart protection during IR [7,128,152]. Moreover, as exercise training can limit calpain activation [152] and ROS-dependent protein carbonylation [12] during IR, the degradation of calcium handling proteins, including SERCA2a [12], is reduced in exercise-trained heart. All these beneficial effects contribute to improve  $\text{Ca}^{2+}$  handling regulation during post-ischemic reperfusion, and certainly to limit mitochondrial matrix  $\text{Ca}^{2+}$  overloading during IR. However, direct proofs are still lacking.

Therefore, one can hypothesize that exercised heart can better cope with calcium overloading during IR and that this might contribute to prevent calcium-dependent mPTP activation in mitochondria. However, only few and contradictory data exist. Magalhães et al [154] reported that swelling in response to  $\text{Ca}^{2+}$  is delayed in mitochondria isolated from exercised hearts. Exercise training results also in increased mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  retention capacity (CRC), suggesting delayed mPTP activation in response to  $\text{Ca}^{2+}$  overload (Fig. 3, point 2). This has been observed also in skeletal muscle from a model of chronic critical ischemia in response to antioxidant treatment (N-acetyl-cysteine) [155], and was obvious in heart mitochondria from healthy [114] and ob/ob mice [115]. The authors explained this last result by the increased phosphorylation of GSK3 $\beta$  in wild type and also ob/ob mice [115]. On the other hand, Starnes et al [113] observed that exercise training reduces mitochondrial ROS production without consequences on mitochondrial tolerance to  $\text{Ca}^{2+}$  overload. Finally, in hearts from rats with type 1 diabetes, exercise training reduces mitochondrial CRC, but only exercise training with insulin therapy can improve mitochondrial CRC [156].

The level of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  has been recently associated with a

physical link between mitochondria and endoplasmic/sarcoplasmic reticulum (ER/SR). The existence of physical links between ER and mitochondria is based on the co-sedimentation of ER particles with mitochondria and electron microscopy observations of the close relationship between mitochondria and ER [157]. It has been proposed that such ER-mitochondrial associations, named mitochondria-associated membranes (MAMs), include a variety of proteins, such as the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3R) on the ER, voltage-dependent anion-selective channel protein (VDAC) in mitochondria, and GRP75 that regulates ER-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transfer. Among the biological functions of ER/SR-mitochondria interactions,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has a pivotal role. During IR, inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  entry in mitochondria, using pharmacological agents or by genetic ablation of MCU, reduces necroptosis and apoptosis [158], notably by modulating calcium imbalance [159], mitochondrial potential and ROS production [160], and by blocking mPTP opening [161]. As reviewed recently [162], ER-mitochondrial interactions contribute to several key processes during IR, such as autophagy, calcium imbalance, mitochondrial fission, ROS production, and apoptosis. However, the effect of exercise training on MAMs has never been investigated. How exercise training might influence MAMs and mitochondrial function during IR could constitute an innovative research axis.

To summarize, exercise training clearly influences the ability of cardiac cells to regulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and to protect key calcium handling proteins during IR. It is not known whether this could contribute to prevent mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload during IR, leading to cardiac protection during IR. It seems that in exercised heart, mitochondria are less sensitive to  $\text{Ca}^{2+}$  overloading, but with conflicting results. Finally, although MAMs are an interesting new target to decipher the cardioprotective effect of exercise training, no data is available on this topic. Additional studies are needed to improve our understanding of the interplay between calcium homeostasis and mitochondria in exercise-induced cardioprotection.

#### 4.4. Nitric oxide bioavailability and mitochondria

Nitric oxide (NO), a freely diffusible gaseous compound, is implicated in different biological processes, such as neurotransmission [163] and vascular tone regulation [164]. This molecule is produced by the conversion of L-arginine to L-citrulline in the presence of oxygen by NO synthases (NOSs). Exogenous NO sources also exist, such as S-nitroglutathione, nitroglycerine and nitrite.

Exercise training can increase NO bioavailability in the cardiovascular system [165] and also in other tissues, for instance the adipose tissue [140,141,167]. This effect is mainly dependent on the activation of the endothelial isoform of NOS (eNOS) [10,137]. In the heart, exercise has no impact on eNOS level, but it increases eNOS phosphorylation on its main activation site (ser1177) and its dimerization [169]. Calvert et al [168] reported that eNOS activation with exercise is dependent on  $\beta$ 3-adrenergic receptor stimulation by catecholamine. The impact of exercise training on other NOS isoforms is less evident. In myocardium, exercise effect on neuronal NOS (nNOS) remains controversial, with [170] or without [9,10] positive actions. Exercise does not have any effect on inducible NOS (iNOS) in healthy rodents [9,10].

Interestingly, the ability of exercise training to activate eNOS constitutes a key trigger of exercise-induced cardioprotection. Genetic ablation [168] or pharmacological inhibition of eNOS (by L-NAME or L-NIO) [169] abolishes exercise-induced cardioprotection in rodents. Moreover, Calvert et al [168] demonstrated that genetic ablation of  $\beta$ 3-adrenergic receptors abolishes the ability of exercise to activate eNOS, resulting in the total loss of cardioprotection. This eNOS-dependent cardioprotection is mediated through the increase of NO metabolites storage (i.e., nitrite and S-nitrothiols) before ischemia and higher protein S-nitrosylation during early reperfusion, without significant changes in cGMP level [169]. Although eNOS role in exercise-induced cardioprotection seems obvious, the underlying mechanisms and the

interplay between eNOS-NO and mitochondria are not clear.

The endothelial isoform of NOS is involved in several cardioprotective pathways. First, eNOS role was explained by activation of the NO-cyclic guanosine monophosphate-cGMP-dependent protein kinase (NO-cGMP-PKG) pathway [171]. However, recent results by Elizabeth Murphy's group suggest that NO protective effect is not related primarily to activation of the soluble guanylate cyclase (sGC)/cGMP/PKG signaling pathway, but to direct protein S-nitrosylation by NO [172]. This was confirmed by the finding that selective deletion of PKG in cardiomyocytes has no effect on cardioprotection by post-conditioning or by using a mitochondrial-specific NO donor (mitoSNO) [173]. In the last decade, protein S-nitrosylation, defined as the binding of one NO moiety to a thiol group of a cysteine residue [174], has emerged as an important modulator of cardiovascular functions, and might have a major role in cardioprotection mechanisms. This post-translational modification can alter protein activity, but also prevent the irreversible oxidation of cysteine thiol groups. S-nitrosylation plays important roles in the cardioprotection by ischemic pre-conditioning [141,175]. As previously reviewed by Sun and Murphy [175], more than 1000 proteins are S-nitrosylated in the heart, and mitochondrial proteins constitute key targets of NO-dependent cardioprotection [176]. S-nitrosylation of mitochondrial proteins influences many mitochondrial functions, such as  $Ca^{2+}$  handling, mPTP opening and mitochondrial respiration [177–179]. Accordingly, heart incubation with a mitochondrial-specific NO donor (mitoSNO) protects the heart during IR [141], and improves post-myocardial infarction cardiac function [180]. Chouchani et al [141] proposed that this protection is explained by specific S-nitrosylation of the ND3 subunit of mitochondrial complex I after ischemia. This leads to a transient block of complex I in a low activity state and limits ROS production during reperfusion. MitoSNO also reversibly inhibits mitochondrial respiration by competing with  $O_2$  on the ferric heme group of complex IV (cytochrome C oxidase) in the electron transport chain [181]. Moreover NO binding to complex IV confers cell resistance to apoptosis [182]. In addition, S-nitrosylation of cyclophilin D, a critical regulator of mPTP activation, preserves mitochondrial integrity during IR [183,184]. Thus, considerable data have been accumulated on the key role of NO bioavailability close to mitochondria in protecting the myocardium during the first minute of reperfusion. The existence of an intrinsic mitochondrial NOS (mtNOS) is still debated, and no conclusive evidence has been provided. Indeed, there is no evidence that the different NOS isoforms harbor a mitochondrial targeting sequence that allows passing through the inner mitochondrial membrane [185]. However, eNOS might dock to the outer mitochondrial membrane and provide a source of NO close to the mitochondrial respiratory enzymes [186]. In agreement, Sun et al [187] demonstrated that methyl-beta-cyclodextrin (MbetaCD), a cholesterol-sequestering agent that disrupts caveolae and blunts the association of eNOS with caveolin-3, abolishes ischemic pre-conditioning-induced S-nitrosylation of mitochondrial proteins and consequently cardioprotection. This work suggests that caveolin-3 is implicated in transducing eNOS/NO/S-nitrosylation cardioprotective signaling to mitochondria, the end effector. Finally, swimming training induces mitochondrial biogenesis in an eNOS-dependent manner [63].

In conclusion, NO seems a potent cardioprotective molecule; however, when NO levels are too high, especially in pro-oxidative conditions such as during IR, NO reacts with ROS to produce RNS [188]. Nitro-oxidative stress, through tyrosine nitration, might also contribute to mitochondrial dysfunction during IR [189]. In obese mice, high iNOS level in the myocardium is associated with increased protein nitrotyrosination and higher heart vulnerability to IR. Interestingly, iNOS level is normalized by exercise training that contributes to reduce the nitro-oxidative stress and heart sensitivity to IR [190].

Thus, strong indirect evidences suggest that eNOS role in exercise-induced cardioprotection could be explained by NO-mitochondria interactions (Fig. 3, point 3). However, direct proofs are lacking.

#### 4.5. Mitochondrial networks and mitophagy

Imbalance in the mitochondrial network dynamics is associated with many disorders, including cardiovascular disease [191,192]. Brady et al. [193] and then others [194–196] described changes in mitochondrial morphology in HL-1 cardiac muscle cells upon sustained ischemia. They observed a shift towards mitochondrial fission associated with loss of mitochondrial fusion. Mitochondrial fission during IR contributes to explain the heart dysfunction and injuries [194–196]. Excessive mitochondrial fission leads to apoptosis activation during cardiac IR injury [197]. Conversely, inhibition of mitochondrial fission exerts cardioprotection [194,195]. In agreement, Ong et al [197] demonstrated that inhibition of DRP1 (mitochondria fission promoter) reduces mitochondrial fragmentation in rat cardiomyocytes during IR injury and increases the proportion of adult cardiac myocytes with elongated mitochondria. This was confirmed in healthy [194,198,199] and diabetic rodents [200], and was associated with fewer cardiac injuries following IR [195,201,202]. Moreover, the administration of a pharmacological mitochondrial fusion promoter prior to ischemia induction also exerts cardioprotection by improving both cardiac mitochondrial function and dynamics regulation [194]. Therefore, limiting mitochondrial fission and promoting mitochondrial fusion at reperfusion onset are efficient cardioprotective strategies (Fig. 3, point 4).

The mechanisms leading to mitochondrial fission during IR remain unclear. The complex interplay between ROS production and  $Ca^{2+}$  overload during IR is directly involved in excessive mitochondrial fission [203,204]. Plotnikov and co-workers [205] reported that pretreatment with a mitochondrial-targeted antioxidant (SkQ1) limits IR-induced mitochondrial fragmentation [205]. In addition, incubation with thapsigargin to induce  $Ca^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum resulted in mitochondrial fission in neonatal rat ventricular cardiomyocytes [203]. This effect was mediated by calcineurin-dependent activation of DRP1 that subsequently promoted mitochondrial fission. Physical exercise represents an efficient strategy to regulate calcium homeostasis [152] and to improve the antioxidant status [148,149,206,207]. Both could contribute to blunt mitochondrial fission during IR. To the best of our knowledge, only one study proposed that mitochondrial dynamics could be implicated in exercise-induced cardioprotection [85]. However, only biochemical measurements were provided in this study without data on mitochondrial morphology, network and function. The authors reported higher *Mfn1* and *Mfn2* levels and lower *Drp1* level in the heart of exercise-trained rats after IR [85]. Similarly, Jiang et al [208] showed that 8 weeks of aerobic interval training performed after myocardial infarction influences mitochondrial function and limits the pathological remodeling of the mitochondrial network. In this work, aerobic interval training increased *Mfn2* and *Opa1* level and decreases *Drp1* expression. Inactivation of the ERK1/2-JNK-P53 signaling pathway and increased nuclear levels of PGC-1 $\alpha$  might explain the beneficial effect of exercise training. Thus, one can hypothesize that exercise training can also influence mitochondrial dynamics during IR and that this could contribute to modulate heart vulnerability.

Mitophagy is another important feature of mitochondrial dynamics [209]. Mitophagy is an essential housekeeping process to maintain functional mitochondria and eliminate impaired mitochondria. Recent studies suggest a specific role of mitophagy regulators in cardioprotection [210–212]. However, the exact nature of the relationship between mitophagy and cardioprotection is still unclear. The role of mitophagy in exercise-induced cardioprotection has been discussed [213], and a recent study showed that following acute exercise pre-conditioning, increased autophagy after 30 min is converted into mitophagy within 24 h, and is associated with cardioprotection [214]. Administration of wortmannin, to inhibit autophagy, led to the attenuation of exercise-induced cardioprotection. However, the objective of this work was to protect the heart against heart injuries caused by

exhausting exercise, and no data on mitophagy during IR was provided.

Although exercise modulation of the mitochondrial network during stress could contribute to exercise-induced cardioprotection, strong scientific evidences are lacking and additional studies are needed. Particularly, two different aspects need to be clarified, i) the direct or indirect (through the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and redox homeostasis) effect of exercise training on the heart mitochondrial network, and ii) the link between mitochondrial network rearrangement and heart sensitivity to IR.

#### 4.6. Mitochondria and inflammatory stress

Mitochondria are implicated in various innate immune pathways [215]. Mitochondria can stimulate the innate immune system through production of DAMPs that are implicated in many inflammation diseases. Moreover, mitochondrial dysfunctions have been linked to activation of the NLRP3 inflammasome, a molecular platform activated in response to cell danger to trigger the innate immune defenses. Activation of the innate immune system leads to inflammation, participates in IR injury, and can persist weeks or months after the first damage [216]. Consequently, fibrotic scar tissue will replace dead cells with an important tissue remodeling for months after IR injury [217]. These mechanisms can lead to structural and functional alterations in organs that may cause long-term consequences, for instance, chronic heart disease.

Therefore, modulation of inflammation might partly explain the beneficial effects of exercise-induced cardioprotection. Although it is accepted that some beneficial effects of regular exercise are exerted through its anti-inflammatory effects [218], acute exercise also increases the production of inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)  $1\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) [101], linked to ROS release [101]. However, this acute pro-inflammatory response could contribute to the beneficial adaptations observed in response to exercise training. Indeed, as mentioned above (section 2c), some studies showed that IL- $1\beta$  and TNF $\alpha$  activate MnSOD [101,219]. In the heart, acute exercise can also trigger activation of the NLRP3 inflammasome. On the other hand, some authors found that the blood levels of IL-6 and TNF $\alpha$  were not changed after 3 weeks of exercise training [220]. Conversely, others reported that exercise training is associated with a reduction of inflammatory cytokines in the heart [221,222].

IR is associated with a pathological activation of the immune system [223], and mitochondria participate in this inflammatory response in the heart [224]. In several pathological situations, exercise training is an efficient strategy to reduce inflammation. Recently, Otaka et al [225] reported that exercise training increases the level of circulating myonectin, a myokine secreted by skeletal muscle in response to exercise. Myonectin contributes to protect the heart during IR by suppressing apoptosis and inflammation. In diabetic animals that underwent IR, exercise training reduces the levels of TNF $\alpha$  [226] and iNOS [190], two drivers of inflammation. The normalization of iNOS overexpression in this model contributed to explain the cardioprotective effect of exercise training. Nevertheless, these studies did not assess or discuss the role of mitochondria. Physical activity also increases sirtuin 1 (SIRT1) signaling, which contributes to reduce cardiac inflammation [221]. SIRT1 is a NAD $^{+}$ -dependent protein deacetylase that suppresses NF- $\kappa$ B signaling via deacetylation, leading to lower pro-inflammatory cytokines [227,228]. SIRT1 upregulation also promotes complex I activity [227] and limits cardiac mitochondrial alterations in diabetic cardiomyopathy [229]. Another interesting study on aging and cardiac inflammation found that as expected, aging leads to higher TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, COX2 and iNOS expression, while exercise training alleviates this effect. Aging also causes deterioration of mitochondrial functions and higher oxidative stress [230]. The authors proposed that exercise training may enhance SIRT1, PGC-1 $\alpha$  and AMPK expression in cardiomyocytes, and thus limits the aging-induced expression of pro-inflammatory mediators and promotes energetic metabolic adaptations.

To conclude, exercise training can clearly modulate cardiac cell

inflammation in several pathologies, including IR. The link between the modulation of mitochondrial defects and inflammation in response to exercise training remains unclear. New studies should investigate the implication of exercise-induced reduction of inflammation in IR and the potential links with mitochondria.

#### 4.7. Exercise training, remote conditioning of cardiac mitochondria?

Cardioprotection in response to exercise training could also be explained by remote conditioning. Michelsen et al [231] were the first to report that cardioprotection can be transferred from an exercise pre-conditioned human to an isolated perfused rabbit heart. They suggested a role of opioid receptors in this remote transferable cardioprotection, because cardioprotection was abolished in the presence of naxolone, an antagonist of opioid receptors. In this study, interaction with mitochondria was not tested; however, it is known that stimulation of  $\kappa$ -opioid receptors in the heart delays mPTP opening in response to  $\text{Ca}^{2+}$  [232]. Several candidates have been proposed to explain the ability of exercise training to induce remote cardiac conditioning. Among the circulating transferable factors, red blood cells are an important source of NO, a well-known protecting agent (see chapter 3d). Indeed, as previously reviewed [233], increased shear stress during exercise stimulates NO metabolic activity of red blood cells. This might contribute to protect the heart against IR insults. High stimulation of skeletal muscles during exercise also could be implicated in remote conditioning. During exercise, muscles produce several cytokines that are considered potent remote cardioprotective molecules (for review [234]). McGinnis et al [235] showed that exercise exerts cardioprotection via IL-6 that originates from skeletal muscle. These authors did not provide any link between IL-6 and mitochondrial function; however, it is known that IL-6 increases the inner mitochondrial membrane polarization and prevents reperfusion-induced changes in mitochondrial functions [236]. Moreover, irisin, another myokine secreted by skeletal muscle in response to exercise [237], suppresses mPTP activation, mitochondrial swelling, and thus protects the heart during IR [238]. Increased SOD1 level in the heart could explain irisin-induced protection of heart mitochondria. Finally, myonectin is another exercise-induced myokine that contributes to exercise-induced cardioprotection by reducing apoptosis and inflammation in the heart during IR [225]. However, no evidence of potential interactions between myonectin and mitochondria has been provided yet. Other blood circulating factors, also described as exerkines, such as extra-cellular vesicles [239], plasmatic microRNAs, including miR-1192 [240] and miR-342-5p [241], or brain-derived neurotrophic factor [242] could be good candidates to explain remote conditioning of the heart by exercise. However, no data is available on their possible interaction with mitochondria, especially during IR.

To conclude, it is not known yet whether the heart is intrinsically or remotely conditioned in response to exercise. As exercise training is a systemic and integrative strategy that influences several organs/tissues, it seems obvious that complex interplays between several remote and intrinsic pathways contribute to protect the myocardium during IR (Fig. 3).

## 5. Conclusion

Exercise training is an efficient strategy to reduce cardiovascular risk factors. Exercise training can also decrease the heart sensitivity to IR in animal models and in humans [243]. However, the cellular mechanisms of exercise-induced cardioprotection remain elusive. In this review, we tried to summarize the potential links between signaling pathways activated by exercise training and mitochondria. Mitochondria are an end-effector of cell death during IR, but are also organelles towards which all cardioprotective pathways converge. Nevertheless, many potential pathways remain to be investigated and few definitive conclusions can be drawn. Exercise training can clearly influence the

cardiac cell redox state and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and both could contribute indirectly to render the mitochondria less sensitive to IR. Conversely, the direct effect of exercise training on mitochondrial function in the heart is less evident. Future studies should determine how exercise training can influence i) the regulation of the mitochondrial network, ii) the mitochondrial regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  handling and mPTP activation, iii) the complex interplay between inflammation and mitochondria, and finally iv) the interaction between mitochondria and exercise-dependent redox-signaling. This could help to improve our understanding of the cardioprotection mechanisms and perhaps, to identify new protective pathways.

### Acknowledgements

This work was supported by a PhD grant to D.B from the SFR Tersys and by a PhD mobility grant to D.B from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire. C.R and F.C are scientists from Avignon University.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.005>.

### References

- [1] E.J. Benjamin, S.S. Virani, C.W. Callaway, A.M. Chamberlain, A.R. Chang, S. Cheng, S.E. Chiuve, M. Cushman, F.N. Delling, R. Deo, S.D. de Ferranti, J.F. Ferguson, M. Fornage, C. Gillespie, C.R. Isasi, M.C. Jiménez, L.C. Jordan, S.E. Judd, D. Lackland, J.H. Lichtman, L. Lisabeth, S. Liu, C.T. Longenecker, P.L. Lutsey, J.S. Mackey, D.B. Matchar, K. Matsushita, M.E. Mussolino, K. Nasir, M. O'Flaherty, L.P. Palaniappan, A. Pandey, D.K. Pandey, M.J. Reeves, M.D. Ritchey, C.J. Rodriguez, G.A. Roth, W.D. Rosamond, U.K.A. Sampson, G.M. Satou, S.H. Shah, N.L. Spartano, D.L. Tirschwell, C.W. Tsao, J.H. Voeks, J.Z. Willey, J.T. Wilkins, J.H. Wu, H.M. Alger, S.S. Wong, P. Muntner, American heart association council on epidemiology and prevention statistics committee and stroke statistics subcommittee, heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American heart association, *Circulation* 137 (2018) e67–e492, <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>.
- [2] D. Thompson Paul, Buchner David, L. Piña Ileana, J. Balady Gary, Mark A. Williams, H. Marcus Bess, Berra Kathy, N. Blair Steven, Fernando Costa, Franklin Barry, F. Fletcher Gerald, P. Gordon Neil, R. Pate Russell, L. Rodriguez Beatriz, K. Yancey Antonette, K. Wenger Nanette, Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease, *Circulation* 107 (2003) 3109–3116, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000075572.40158.77>.
- [3] J. Brinks, A. Fowler, B.A. Franklin, J. Dulai, Lifestyle modification in secondary prevention, *Am. J. Lifestyle Med.* 11 (2016) 137–152, <https://doi.org/10.1177/15598276166651402>.
- [4] M.A. Nystoriak, A. Bhatnagar, Cardiovascular effects and benefits of exercise, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018), <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00135>.
- [5] J.C. Quindry, Exercise-induced cardioprotection and the therapeutic potential of RIPc, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Therapeut.* 22 (2017) 397–403, <https://doi.org/10.1177/1074248417715005>.
- [6] H. Ejlersen, Z.J. Andersen, M.C. von Euler-Chelpin, P.P. Johansen, P. Schnohr, E. Prescott, Prognostic impact of physical activity prior to myocardial infarction: case fatality and subsequent risk of heart failure and death, *Eur. J. Prev. Cardiol.* 24 (2017) 1112–1119, <https://doi.org/10.1177/2047487317702046>.
- [7] J.Q. Kwong, J.D. Molkenin, Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart, *Cell Metabol.* 21 (2015) 206–214, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>.
- [8] K.E. Conley, Mitochondria to motion: optimizing oxidative phosphorylation to improve exercise performance, *J. Exp. Biol.* 219 (2016) 243–249, <https://doi.org/10.1242/jeb.126623>.
- [9] M. Fiorenza, A.K. Lemminger, M. Marker, K. Eilbye, F.M. Iala, J. Bangsbo, M. Hostrup, High-intensity exercise training enhances mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency in a temperature-dependent manner in human skeletal muscle: implications for exercise performance, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 33 (2019) 8976–8989, <https://doi.org/10.1096/fj.201901068RRR>.
- [10] D.A. Hood, Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 14th International Biochemistry of Exercise Conference – muscles as Molecular and Metabolic Machines, and has undergone the Journal's usual peer review process, *Appl. Physiol. Nutr. Metabol.* 34 (2009) 465–472, <https://doi.org/10.1139/H09-045>.
- [11] H. Wang, Y. Bei, Y. Lu, W. Sun, Q. Liu, Y. Wang, Y. Cao, P. Chen, J. Xiao, X. Kong, Exercise prevents cardiac injury and improves mitochondrial biogenesis in advanced diabetic cardiomyopathy with PGC-1 $\alpha$  and akt activation, *Cell. Physiol. Biochem.* 35 (2015) 2159–2168, <https://doi.org/10.1159/000374021>.
- [12] J.P. French, K.L. Hamilton, J.C. Quindry, Y. Lee, P.A. Upchurch, S.K. Powers, Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22 (2008) 2862–2871, <https://doi.org/10.1096/fj.07-102541>.
- [13] K.L. Hamilton, J.L. Staib, T. Phillips, A. Hess, S.L. Lennon, S.K. Powers, Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 800–809, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01431-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01431-4).
- [14] S.-B. Ong, P. Samangouei, S.B. Kalkhoran, D.J. Hausenloy, The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78 (2015) 23–34, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.005>.
- [15] E.T. Chouchani, V.R. Pell, A.M. James, L.M. Work, K. Saeb-Parsy, C. Frezza, T. Krieg, M.P. Murphy, A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury, *Cell Metabol.* 23 (2016) 254–263, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009>.
- [16] S. Cadenas, ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection, *Free Radic. Biol. Med.* 117 (2018) 76–89, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024>.
- [17] J. Hom, S.-S. Sheu, Morphological dynamics of mitochondria — a special emphasis on cardiac muscle cells, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46 (2009) 811–820, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.023>.
- [18] M. Bonora, M.R. Wieckowski, D.A. Sinclair, G. Kroemer, P. Pinton, L. Galluzzi, Targeting mitochondria for cardiovascular disorders: therapeutic potential and obstacles, *Nat. Rev. Cardiol.* 16 (2019) 33–55, <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0074-0>.
- [19] S.-B. Ong, D.J. Hausenloy, Mitochondrial morphology and cardiovascular disease, *Cardiovasc. Res.* 88 (2010) 16–29, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq237>.
- [20] K. Boengler, S. Stahlhofen, A. van de Sand, P. Gres, M. Ruiz-Meana, D. Garcia-Dorado, G. Heusch, R. Schulz, Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfilamentary cardiomyocyte mitochondria, *Basic Res. Cardiol.* 104 (2009) 141–147, <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0007-5>.
- [21] R. Heinzl Frank, Yukun Luo, Xiaokui Li, Boengler Kerstin, Buechert Astrid, Garcia-Dorado David, Fabio Di Lisa, Schulz Rainer, Heusch Gerd, Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice, *Circ. Res.* 97 (2005) 583–586, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000181171.65293.65>.
- [22] A. Denuc, E. Núñez, E. Calvo, M. Loureiro, E. Miro-Casas, A. Guarás, J. Vázquez, D. Garcia-Dorado, New protein–protein interactions of mitochondrial connexin 43 in mouse heart, *J. Cell Mol. Med.* 20 (2016) 794–803, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12792>.
- [23] K. Boengler, M. Kosiol, M. Mayr, R. Schulz, S. Rohrbach, Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 8 (2017) 349–369, <https://doi.org/10.1002/jcsm.12178>.
- [24] A. Rodríguez-Sinovas, M. Ruiz-Meana, A. Denuc, D. García-Dorado, Mitochondrial Cx43, an important component of cardiac preconditioning, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1860 (2018) 174–181, <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2017.06.011>.
- [25] E. Barth, G. Stämmler, B. Speiser, J. Schaper, Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24 (1992) 669–681.
- [26] R. Ventura-Clapier, A. Garnier, V. Veksler, F. Joubert, Bioenergetics of the failing heart, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 1360–1372, <https://doi.org/10.1016/j.jbbamer.2010.09.006>.
- [27] T. Doenst, T.D. Nguyen, E.D. Abel, Cardiac metabolism in heart failure - implications beyond ATP production, *Circ. Res.* 113 (2013) 709–724, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>.
- [28] Bertero Edoardo, Maaack Christoph, Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria, *Circ. Res.* 122 (2018) 1460–1478, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310082>.
- [29] R.M. Denton, Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787 (2009) 1309–1316, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>.
- [30] E.J. Griffiths, G.A. Rutter, Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1787 (2009) 1324–1333, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.019>.
- [31] R. Harisseh, M. Abrial, P. Chiari, R. Al-Mawla, C. Villedieu, N. Tessier, G. Bidaux, M. Ovize, A. Gharib, A modified calcium retention capacity assay clarifies the roles of extra- and intracellular calcium pools in mitochondrial permeability transition pore opening, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 15282–15292, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009477>.
- [32] D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott, Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release, *Physiol. Rev.* 94 (2014) 909–950, <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.
- [33] E.N. Dedkova, L.K. Seidmayer, L.A. Blatter, Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 59 (2013) 41–54, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.016>.
- [34] C.X.C. Santos, S. Raza, A.M. Shah, Redox signaling in the cardiomyocyte: from physiology to failure, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 74 (2016) 145–151, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.03.002>.
- [35] R.J. Youle, A. Strasser, The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 47–59, <https://doi.org/10.1038/nrm2308>.
- [36] C. Manechote, S. Palee, S.C. Chattipakorn, N. Chattipakorn, Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury, *J. Cell Mol. Biol.*

- Med. 21 (2017) 2643–2653, <https://doi.org/10.1111/jcmm.13330>.
- [37] G. Morciano, M. Bonora, G. Campo, G. Aquila, P. Rizzo, C. Giorgi, M.R. Wieckowski, P. Pintor, Mechanistic role of mPTP in ischemia-reperfusion injury, in: G. Santulli (Ed.), *Mitochondrial Dyn. Cardiovasc. Med.* Springer International Publishing, Cham, 2017, pp. 169–189, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_9).
- [38] A.E. Consolini, M.L. Ragone, P. Bonazzola, G.A. Colareda, Mitochondrial bioenergetics during ischemia and reperfusion, *Adv. Exp. Med. Biol.* 982 (2017) 141–167, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_8).
- [39] A. Görlach, K. Bertram, S. Hudcovca, O. Krizanova, Calcium and ROS: a mutual interplay, *Redox Biol* 6 (2015) 260–271, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>.
- [41] G. Hajnóczky, G. Csordás, S. Das, C. García-Pérez, M. Saotome, S. Sinha Roy, M. Yi, Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in apoptosis, *Cell Calcium* 40 (2006) 553–560, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.016>.
- [42] D.B. Zorov, C.R. Filburn, L.O. Klotz, J.L. Zweier, S.J. Sollott, Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1001–1014.
- [43] E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, S.M. Nadtochiy, E.N.J. Ord, A.C. Smith, F. Eyassu, R. Shirley, C.-H. Hu, A.J. Dare, A.M. James, S. Rogatti, R.C. Hartley, S. Eaton, A.S.H. Costa, P.S. Brookes, S.M. Davidson, M.R. Duchon, K. Saeb-Parsy, M.J. Shattock, A.J. Robinson, L.M. Work, C. Frezza, T. Krieg, M.P. Murphy, Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS, *Nature* 515 (2014) 431–435, <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
- [44] Q. Chen, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky, Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 319 (3) (2006) 1405–1412, <https://doi.org/10.1124/jpet.106.110262>.
- [45] M. Ovize, G.F. Baxter, F. Di Lisa, P. Ferdinandy, D. García-Dorado, D.J. Hausenloy, G. Heusch, J. Vinten-Johansen, D.M. Yellon, R. Schulz, Working group of cellular biology of heart of European society of cardiology, postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the working group of cellular biology of the heart of the European society of cardiology, *Cardiovasc. Res.* 87 (2010) 406–423, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq129>.
- [46] S.Y. Lim, D.J. Hausenloy, S. Arjun, A.N. Price, S.M. Davidson, M.F. Lythgoe, D.M. Yellon, Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure, *J. Cell Mol. Med.* 15 (2011) 2443–2451, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01235.x>.
- [47] P.C. Waldmeier, J.-J. Feldtrauer, T. Qian, J.J. Lemasters, Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 22–29, <https://doi.org/10.1124/mol.62.1.22>.
- [48] N. Mewton, T.T. Cung, O. Morel, G. Cayla, E. Bonnefoy-Cudraz, G. Rioufol, D. Angoulvant, P. Guerin, M. Elbaz, N. Delarche, P. Coste, G. Vanzetto, M. Metge, J.-F. Aupetit, B. Jouve, P. Motreff, C. Tron, J.-N. Labeque, P.G. Steg, Y. Cottin, G. Range, J. Clerc, P. Coussement, F. Prunier, F. Moulin, O. Roth, L. Belle, P. Dubois, P. Barragan, M. Gilard, C. Piot, P. Colin, M.-C. Morice, J.-P. Moassier, O. Ider, J.L.P. Dubois-Randé, T. Untersee, H. Lebreton, T. Beard, D. Blanchard, G. Grollier, V. Malquarti, P. Staat, A. Sudre, M.J. Hansson, E. Elmer, I. Boussaha, C. Jossan, A. Torner, M. Claeys, D. García-Dorado, M. Ovize, CIRCUS Study Investigators, Rationale and design of the Cyclosporine to Improve Clinical Outcome in ST-elevation myocardial infarction patients (the CIRCUS trial), *Am. Heart J.* 169 (2015) 758–766, <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2015.02.020>.
- [49] T.-T. Cung, O. Morel, G. Cayla, G. Rioufol, D. García-Dorado, D. Angoulvant, E. Bonnefoy-Cudraz, P. Guérin, M. Elbaz, N. Delarche, P. Coste, G. Vanzetto, M. Metge, J.-F. Aupetit, B. Jouve, P. Motreff, C. Tron, J.-N. Labeque, P.G. Steg, Y. Cottin, G. Range, J. Clerc, M.J. Claeys, P. Coussement, F. Prunier, F. Moulin, O. Roth, L. Belle, P. Dubois, P. Barragan, M. Gilard, C. Piot, P. Colin, F. De Poli, M.-C. Morice, O. Ider, J.-L. Dubois-Randé, T. Untersee, H. Le Breton, T. Béard, D. Blanchard, G. Grollier, V. Malquarti, P. Staat, A. Sudre, E. Elmer, M.J. Hansson, C. Bergerot, I. Boussaha, C. Jossan, G. Derumeaux, N. Mewton, M. Ovize, Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1021–1031, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505489>.
- [50] S.K. Powers, A.J. Smuder, A.N. Kavazis, J.C. Quindry, Mechanisms of exercise-induced cardioprotection, *Physiol. Bethesda Md* 29 (2014) 27–38, <https://doi.org/10.1152/physiol.00030.2013>.
- [51] K. Fulghum, B.G. Hill, Metabolic mechanisms of exercise-induced cardiac remodeling, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018), <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00127>.
- [52] J.R. Huertas, R.A. Casuso, P.H. Agustín, S. Cogliatti, Stay fit, stay young: mitochondria in movement: the role of exercise in the new mitochondrial paradigm, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2019) 7058350, <https://doi.org/10.1155/2019/7058350>.
- [53] S.J. Hwang, W. Kim, Mitochondrial dynamics in the heart as a novel therapeutic target for cardioprotection, *Chonnam Med. J.* 49 (2013) 101–107, <https://doi.org/10.4068/cmj.2013.49.3.101>.
- [54] W.C. Stanley, F.A. Recchia, G.D. Lopaschuk, Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 1093–1129, <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>.
- [55] M.M. Mihaylova, R.J. Shaw, The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 1016–1023, <https://doi.org/10.1038/ncb2329>.
- [56] C. Cantó, Z. Gerhart-Hines, J.N. Feige, M. Lagouge, L. Noriega, J.C. Milne, P.J. Elliott, P. Puigserver, J. Auwerx, AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity, *Nature* 458 (2009) 1056–1060, <https://doi.org/10.1038/nature07813>.
- [57] B.B. Kahn, T. Alquier, D. Carling, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *Cell Metabol.* 1 (2005) 15–25, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>.
- [58] M.C. Towler, D.G. Hardie, AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling, *Circ. Res.* 100 (2007) 328–341, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000256090.42690.05>.
- [59] J.C. Chatham, Lactate – the forgotten fuel, *J. Physiol.* 542 (2002), <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.020974.333-333>.
- [60] G.W. Goodwin, H. Taegtmeyer, Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 279 (2000) H1490–H1501, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.4.H1490>.
- [61] C.G.R. Perry, Mitochondrial adaptations to exercise in human skeletal muscle: a possible role for cristae density as a determinant of muscle fitness, *J. Physiol.* 595 (2017) 2773–2774, <https://doi.org/10.1113/JP273549>.
- [62] T. Tuomainen, P. Tavi, The role of cardiac energy metabolism in cardiac hypertrophy and failure, *Exp. Cell Res.* 360 (2017) 12–18, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.052>.
- [63] R. Vetter, A. Valerio, M. Ragni, E. Trevisan, M. Granzotto, M. Olivieri, L. Tedesco, C. Ruocco, A. Fossati, R. Fabris, R. Serra, M.O. Carruba, E. Nisoli, Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism, *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 306 (2014) E519–E528, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00617.2013>.
- [64] P. Dobrzyn, A. Pyrkowska, M.K. Duda, T. Bednarski, M. Maczewski, J. Langfort, A. Dobrzyn, Expression of lipogenic genes is upregulated in the heart with exercise training-induced but not pressure overload-induced left ventricular hypertrophy, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304 (2013) E1348–E1358, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00603.2012>.
- [65] V. Castro, B. Grisdale-Helland, S.J. Helland, J. Torgersen, T. Kristensen, G. Claireaux, A.P. Farrell, H. Takle, Cardiac molecular-acclimation mechanisms in response to swimming-induced exercise in Atlantic salmon, *PLoS One* 8 (2013) e55056, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055056>.
- [66] A. Bonen, The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle, *Eur. J. Appl. Physiol.* 86 (2001) 6–11, <https://doi.org/10.1007/s004210100516>.
- [67] D.L. Coven, X. Hu, L. Cong, R. Bergeron, G.I. Shulman, D.G. Hardie, L.H. Young, Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285 (2003) E629–E636, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00171.2003>.
- [68] A.S. Marsin, L. Bertrand, M.H. Rider, J. Deprez, C. Beauloye, M.F. Vincent, G. Van den Bergh, D. Carling, L. Hue, Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia, *Curr. Biol. CB.* 10 (2000) 1247–1255, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00742-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00742-9).
- [69] A.D. Hafstad, N.T. Boardman, J. Lund, M. Hage, A.M. Khalid, U. Wisloff, T.S. Larsen, E. Aasum, High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 111 (2011) 1235–1241, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00594.2011>.
- [70] C. Greggio, P. Jha, S.S. Kulkarni, S. Lagarrigue, N.T. Broskey, M. Boutant, X. Wang, S. Conde Alonso, E. Ofori, J. Auwerx, C. Cantó, F. Amati, Enhanced respiratory chain supercomplex formation in response to exercise in human skeletal muscle, *Cell Metabol.* 25 (2017) 301–311, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.004>.
- [71] J.R. Huertas, S. Al Fazazi, A. Hidalgo-Gutierrez, L.C. López, R.A. Casuso, Antioxidant effect of exercise: exploring the role of the mitochondrial complex I superassembly, *Redox Biol* 13 (2017) 477–481, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.009>.
- [72] J. Zhang, C. Tober, M. Erhard, Y. Zhang, K. Ugurbil, R.J. Bache, T. Lange, D.C. Homans, Relationships between myocardial bioenergetic and left ventricular function in hearts with volume-overload hypertrophy, *Circulation* 96 (1997) 334–343, <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.1.334>.
- [73] R.G. Spencer, P.M. Buttrick, J.S. Ingwall, Function and bioenergetics in isolated perfused trained rat hearts, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) H409–H417, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.1.H409>.
- [74] A. Fenning, G. Harrison, D. Dwyer, R. Rose-Meyer, L. Brown, Cardiac adaptation to endurance exercise in rats, *Mol. Cell. Biochem.* 251 (2003) 51–59, [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9238-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9238-3_8).
- [75] S.R. Stuewe, P.A. Gwirtz, N. Agarwal, R.T. Mallet, Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 (2000) 903–913, <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1131>.
- [76] J. Wu, J.L. Ruas, J.L. Estall, K.A. Rasbach, J.H. Choi, L. Ye, P. Boström, H.M. Tyra, R.W. Crawford, K.P. Campbell, D.T. Rutkowski, R.J. Kaufman, B.M. Spiegelman, The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 $\alpha$ /ATF6 $\alpha$  complex, *Cell Metabol.* 13 (2011) 160–169, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.003>.
- [77] Z. Yan, V.A. Lira, N.P. Greene, Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality, *Exerc. Sport Sci. Rev.* 40 (2012) 159–164, <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182575599>.
- [78] J.C. Arcos, R.S. Sohal, S.C. Sun, M.F. Argus, G.E. Burch, Changes in ultrastructure and respiratory control in mitochondria of rat heart hypertrophied by exercise, *Exp. Mol. Pathol.* 8 (1968) 49–65, [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(68\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0014-4800(68)90005-1).
- [79] L.B. Oscai, P.A. Molé, J.O. Holloszy, Effects of exercise on cardiac weight and mitochondria in male and female rats, *Am. J. Physiol.* 220 (1971) 1944–1948, <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.6.1944>.
- [80] E. Dworatzek, S. Mahmoodzadeh, C. Schubert, C. Westphal, J. Leber, A. Kusch,

- G. Kararigas, D. Flegner, M. Moulin, R. Ventura-Clapier, J.-A. Gustafsson, M.M. Davidson, D. Dragun, V. Regitz-Zagrosek, Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta, *Cardiovasc. Res.* 102 (2014) 418–428, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu065>.
- [81] M. Coronado, G. Fajardo, K. Nguyen, M. Zhao, K. Kooiker, G. Jung, D.-Q. Hu, S. Reddy, E. Sandoval, A. Stotland, R.A. Gottlieb, D. Bernstein, Physiological mitochondrial fragmentation is a normal cardiac adaptation to increased energy demand, *Circ. Res.* 122 (2018) 282–295, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310725>.
- [82] T.M. Moore, Z. Zhou, W. Cohn, F. Norheim, A.J. Lin, N. Kalajian, A.R. Strumwasser, K. Cory, K. Whitney, T. Ho, T. Ho, J.L. Lee, D.H. Rucker, O. Shirihai, A.M. van der Blik, J.P. Whitelegge, M.M. Seldin, A.J. Lusis, S. Lee, C.A. Drevon, S.K. Mahata, L.P. Turcotte, A.L. Hevener, The impact of exercise on mitochondrial dynamics and the role of Drp1 in exercise performance and training adaptations in skeletal muscle, *Mol. Metab.* 21 (2019) 51–67, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.11.012>.
- [83] J.R. Huertas, F.J. Ruiz-Ojeda, J. Plaza-Díaz, N.B. Nordsborg, J. Martín-Albo, A. Rueda-Robles, R.A. Casuso, Human muscular mitochondrial fusion in athletes during exercise, *Faseb. J.* 33 (2019) 12087–12098, <https://doi.org/10.1096/fj.201900365RR>.
- [84] D. Jia, L. Hou, Y. Lv, L. Xi, Z. Tian, Postinfarction exercise training alleviates cardiac dysfunction and adverse remodeling via mitochondrial biogenesis and SIRT1/PGC-1 $\alpha$ /PI3K/Akt signaling, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 23705–23718, <https://doi.org/10.1002/jcp.28939>.
- [85] R. Ghahremani, A. Damirchi, I. Salehi, A. Komaki, F. Esposito, Mitochondrial dynamics as an underlying mechanism involved in aerobic exercise training-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury, *Life Sci.* 213 (2018) 102–108, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.035>.
- [86] H. Li, W. Miao, J. Ma, Z. Xv, H. Bo, J. Li, Y. Zhang, L.L. Ji, Acute exercise-induced mitochondrial stress triggers an inflammatory response in the myocardium via NLRP3 inflammasome activation with mitophagy, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016 (2016), <https://doi.org/10.1155/2016/1987149>.
- [87] S.K. Powers, K.J. Soltanek, M.P. Wiggins, H.A. Demirel, A.J. Smuder, Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: the antioxidant players and cardioprotection, *Free Radic. Res.* 48 (2014) 43–51, <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.825371>.
- [88] A.J. Done, T. Traustadóttir, Nrf2 mediates redox adaptations to exercise, *Redox Biol.* 10 (2016) 191–199, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.003>.
- [89] M. Kretschmar, D. Müller, Aging, training and exercise. A review of effects on plasma glutathione and lipid peroxides, *Sports Med. Auckl. NZ.* 15 (1993) 196–209, <https://doi.org/10.2165/00007256-199315030-00005>.
- [90] M.G. Nikolaidis, A. Kyparos, C. Spanou, V. Paschalis, A.A. Theodorou, I.S. Vrabas, Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues, *J. Exp. Biol.* 215 (2012) 1615–1625, <https://doi.org/10.1242/jeb.067470>.
- [91] P. Venditti, G. Napolitano, D. Barone, S. Di Meo, Vitamin E supplementation modifies adaptive responses to training in rat skeletal muscle, *Free Radic. Res.* 48 (2014) 1179–1189, <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.937341>.
- [92] V.R. Muthusamy, S. Kannan, K. Sadhaasivam, S.S. Gounder, C.J. Davidson, C. Boehme, J.R. Hoidal, L. Wang, N.S. Rajasekaran, Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 366–376, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.440>.
- [93] P. Wang, C.G. Li, Z. Qi, D. Cui, S. Ding, Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle, *Exp. Physiol.* 101 (2016) 410–420, <https://doi.org/10.1113/EP085493>.
- [94] G. Shanmugam, A.K. Challa, A. Devarajan, B. Athmanathan, S.H. Litovsky, P. Krishnamurthy, C.J. Davidson, N.S. Rajasekaran, Exercise mediated Nrf2 signaling protects the myocardium from isoproterenol-induced pathological remodeling, *Front. Cardiovasc. Med.* 6 (2019) 68, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00068>.
- [95] M. Hancock, A.D. Hafstad, A.A. Nabeebacus, N. Catibog, A. Logan, I. Smyrnias, S.S. Hansen, J. Lanner, K. Schröder, M.P. Murphy, A.M. Shah, M. Zhang, Myocardial NADPH oxidase-4 regulates the physiological response to acute exercise, *eLife* 7 (2018) e41044, <https://doi.org/10.7554/eLife.41044>.
- [96] T. Ago, J. Kuroda, J. Pain, C. Fu, H. Li, J. Sadoshima, Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes, *Circ. Res.* 106 (2010) 1253–1264, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.213116>.
- [97] S. Kasai, S. Shimizu, Y. Tatara, J. Mimura, K. Itoh, Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology, *Biomolecules* 10 (2020) 320, <https://doi.org/10.3390/biom10020320>.
- [98] A.J. Done, T. Traustadóttir, Nrf2 mediates redox adaptations to exercise, *Redox Biol.* 10 (2016) 191–199, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.003>.
- [99] M.J. Crilly, L.D. Tryon, A.T. Elich, D.A. Hood, The role of Nrf2 in skeletal muscle contractile and mitochondrial function, *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 121 (2016) 730–740, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00042.2016>.
- [100] N. Yamashita, S. Hoshida, K. Otsu, M. Asahi, T. Kuzuya, M. Hori, Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1699–1706.
- [101] L.L. Ji, M.-C. Gomez-Cabrera, N. Steinhilber, J. Vina, Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18 (2004) 1499–1506, <https://doi.org/10.1096/fj.04-1846cnm>.
- [102] E. Lima-Cabello, M.J. Cuevas, N. Garatachea, M. Baldini, M. Almar, J. González-Gallego, Eccentric exercise induces nitric oxide synthase expression through nuclear factor-kappaB modulation in rat skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 108 (2010) 575–583, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00816.2009>.
- [103] M. Balan, M. Locke, Acute exercise activates myocardial nuclear factor kappa B, *Cell Stress Chaperones* 16 (2011) 105–111, <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0217-7>.
- [104] R. Pala, C. Orhan, M. Tuzcu, N. Sahin, S. Ali, V. Cinar, M. Atalay, K. Sahin, Coenzyme Q10 supplementation modulates NF $\kappa$ B and Nrf2 pathways in exercise training, *J. Sports Sci. Med.* 15 (2016) 196–203.
- [105] J. Zoll, B. N'Guessan, F. Ribera, E. Lampert, D. Fortin, V. Veksler, X. Bigard, B. Geny, J. Lonsdorfer, R. Ventura-Clapier, B. Mettauer, Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients, *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (2003) 126–132, [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(03\)00499-6](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(03)00499-6).
- [106] D.K. Bowles, J.W. Starnes, Exercise training improves metabolic response after ischemia in isolated working rat heart, *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 76 (1994) 1608–1614, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.1994.76.4.1608>.
- [107] R.J. Alleman, A.M. Tsang, T.E. Ryan, D.J. Patteson, J.M. McClung, E.E. Spangenberg, S.R. Shaikh, P.D. Neuffer, D.A. Brown, Exercise-induced protection against reperfusion arrhythmia involves stabilization of mitochondrial energetics, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310 (2016) H1360–H1370, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00858.2015>.
- [108] A. Ascensão, R. Ferreira, P.J. Oliveira, J. Magalhães, Effects of endurance training and acute doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation, *Cardiovasc. Toxicol.* 6 (2006) 159–171, <https://doi.org/10.1385/CT:6:3:159>.
- [109] L. Tao, Y. Bei, S. Lin, H. Zhang, Y. Zhou, J. Jiang, P. Chen, S. Shen, J. Xiao, X. Li, Exercise training protects against acute myocardial infarction via improving myocardial energy metabolism and mitochondrial biogenesis, *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 37 (2015) 162–175, <https://doi.org/10.1159/000430342>.
- [110] A.P. Halestrap, S.J. Clarke, S.A. Javadov, Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection, *Cardiovasc. Res.* 61 (2004) 372–385, [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00533-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00533-9).
- [111] P. Bernardi, F. Di Lisa, The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78 (2015) 100–106, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.023>.
- [112] J.W. Starnes, B.D. Barnes, M.E. Olsen, Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup>-induced dysfunction, *J. Appl. Physiol.* 102 (2007) 1793–1798, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00849.2006>.
- [113] M. Marcell, K. Bourduas, A. Asch, Y. Burelle, Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (2006) H1549–H1557, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00913.2005>.
- [114] S. Pons, V. Martin, L. Portal, R. Zini, D. Morin, A. Berdeaux, B. Ghaleh, Regular treadmill exercise restores cardioprotective signaling pathways in obese mice independently from improvement in associated co-morbidities, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 54 (2013) 82–89, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.010>.
- [115] G.J. Gross, R.M. Fryer, Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning, *Circ. Res.* 84 (1999) 973–979, <https://doi.org/10.1161/01.res.84.9.973>.
- [116] K.D. Garlid, P. Pauczek, V. Yarov-Yarovoy, H.N. Murray, R.B. Darbenzio, A.J. D'Alonzo, N.J. Lodge, M.A. Smith, G.J. Grover, Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection, *Circ. Res.* 81 (1997) 1072–1082, <https://doi.org/10.1161/01.res.81.6.1072>.
- [117] J.C. Quindry, L. Miller, G. McGinnis, B. Kliszczewicz, J.M. Irwin, M. Landram, Z. Urbiztondo, G. Nanayakkara, R. Amin, Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis, *J. Appl. Physiol.* 113 (2012) 498–506, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00957.2011>.
- [118] G. Loo, J. Kondapalli, H. Iwase, N.S. Chandel, G.B. Waypa, R.D. Guzy, T.L. Vanden Hoek, P.T. Schumacker, Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 1382–1394, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.008>.
- [119] J.L. Zweier, J.T. Flaberty, M.L. Weisfeldt, Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 1404–1407, <https://doi.org/10.1073/pnas.84.5.1404>.
- [120] P. Korge, S.A. John, G. Calmettes, J.N. Weiss, Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: the role of complex II, *J. Biol. Chem.* 292 (24) (2017) 9896–9905, <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.768325>.
- [121] R.G. Hansford, B.A. Hogue, V. Mildaziene, Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age, *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (1997) 89–95.
- [122] E. Murphy, C. Steenbergen, Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 581–609, <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>.
- [123] S.-K. Myung, W. Ju, B. Cho, S.-W. Oh, S.M. Park, B.-K. Koo, B.-J. Park, Korean Meta-Analysis Study Group, Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials, *BMJ* 346 (2013) f10, <https://doi.org/10.1136/bmj.f10>.
- [124] A. Maroz, R.F. Anderson, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxy radical: implications for in vivo antioxidant activity, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 105–109, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.010>.

- 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.033.
- [126] V.J. Adlam, J.C. Harrison, C.M. Porteous, A.M. James, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, I.A. Sammut, Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury, *FASEB J.* 19 (2005) 1088–1095, <https://doi.org/10.1096/fj.05-3718.com>.
- [127] M. Kihlström, Protection effect of endurance training against reoxygenation-induced injuries in rat heart, *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 68 (1990) 1672–1678, <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.4.1672>.
- [128] Y. Lee, K. Min, E.E. Talbert, A.N. Kavazis, A.J. Smuder, W.T. Willis, S.K. Powers, Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury, *Med. Sci. Sports Exerc.* 44 (2012) 397–405, <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318231e937>.
- [129] S. Judge, Y.M. Jang, A. Smith, C. Selman, T. Phillips, J.R. Speakman, T. Hagen, C. Leeuwenburgh, Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces sub-sarcolemmal and inter-fibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart, *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (2005) R1564–R1572, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00396.2005>.
- [130] A.N. Kavazis, S. Alvarez, E. Talbert, Y. Lee, S.K. Powers, Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 297 (2009) H144–H152, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01278.2008>.
- [131] K.L. Hamilton, J.C. Quindry, J.P. French, J. Staib, J. Hughes, J.L. Mehta, S.K. Powers, MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 1360–1368, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.025>.
- [132] I. Kwon, Y. Jang, W. Song, M.H. Roltshch, Y. Lee, Mitochondrial antioxidant enzymes and endurance exercise-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury, <https://doi.org/10.17140/semj-4-155>, (2018).
- [133] C.R. Frasier, R.L. Moore, D.A. Brown, Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart, *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 111 (2011) 905–915, <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00004.2011>.
- [134] C.R. Frasier, F. Moukdar, H.D. Patel, R.C. Sloan, L.M. Stewart, R.J. Alleman, J.D. La Favor, D.A. Brown, Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria, *Cardiovasc. Res.* 98 (2013) 47–55, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt009>.
- [135] C.X.C. Santos, N. Anilkumar, M. Zhang, A.C. Brewer, A.M. Shah, Redox signaling in cardiac myocytes, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 777–793, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003>.
- [136] A.M. Bellinger, S. Reiken, M. Dura, P.W. Murphy, S.-X. Deng, D.W. Landry, D. Nieman, S.E. Lehnart, M. Samaru, A. LaCampagne, A.R. Marks, Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 2198–2202, <https://doi.org/10.1073/pnas.0711074105>.
- [137] N. Chakouri, C. Reboul, D. Boulghabra, A. Kleindienst, S. Nottin, S. Gayraud, F. Roubille, S. Matecki, A. Lacampagne, O. Cazorla, Stress-induced protein S-glutathionylation and phosphorylation crosslinks in cardiac sarcomeric proteins - impact on heart function, *Int. J. Cardiol.* 258 (2018) 207–216, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.12.004>.
- [138] A.V. Zima, L.A. Blatter, Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters, *Cardiovasc. Res.* 71 (2006) 310–321, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.019>.
- [139] L. Andre, J. Fauconnier, C. Reboul, C. Feillet-Coudray, P. Meschin, C. Farah, G. Fouret, S. Richard, A. Lacampagne, O. Cazorla, Subendocardial increase in reactive oxygen species production affects regional contractile function in ischemic heart failure, *Antioxidants Redox Signal.* 18 (2013) 1009–1020, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4534>.
- [140] D.E. Handy, J. Loscalzo, Redox regulation of mitochondrial function, *Antioxidants Redox Signal.* 16 (2012) 1323–1367, <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4123>.
- [141] E.T. Chouchani, C. Methner, S.M. Nadtochiy, A. Logan, V.R. Pell, S. Ding, A.M. James, H.M. Cothran, R.A.J. Smith, T. Krieg, P.S. Brookes, M.P. Murphy, Cardioprotection by S-nitrosylation of a cysteine switch on mitochondrial complex I, *Nat. Med.* 19 (2013) 753–759, <https://doi.org/10.1038/nm.3212>.
- [142] J. Sun, T. Nguyen, A.M. Aponte, S. Menazza, M.J. Kohr, D.M. Roth, H.H. Patel, E. Murphy, C. Steenbergen, Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria, *Cardiovasc. Res.* 106 (2015) 227–236, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv044>.
- [143] G. Amanakis, J. Sun, M.M. Fergusson, Cysteine 202 of Cyclophilin D is a site of multiple post-translational modifications and plays a role in cardioprotection, *Cardiovasc Res.* (2020), <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa053> [published online ahead of print, 2020 Mar 4], [cvaa053](https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa053).
- [144] S.W. Taylor, E. Fahy, J. Murray, R.A. Capaldi, S.S. Ghosh, Oxidative Post-translational Modification of Tryptophan Residues in Cardiac Mitochondrial Proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19587–19590, <https://doi.org/10.1074/jbc.C300135200>.
- [145] R.J. Mailloux, J.Y. Xuan, S. McBride, W. Maharsy, S. Thorn, C.E. Holterman, C.R.J. Kennedy, P. Rippstein, R. deKemp, J.D. Silva, M. Nemer, M. Lou, M.-E. Harper, Glutaredoxin-2 is required to control oxidative phosphorylation in cardiac muscle by mediating deglutathionylation reactions, *J. Biol. Chem.* 289 (21) (2014) 14812–14828, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550574>.
- [146] N.V. Margaritis, V. Paschalis, A.A. Theodorou, A. Kyparos, M.G. Nikolaidis, Redox basis of exercise physiology, *Redox Biol.* (2020) 101499, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101499>.
- [147] S. Zampieri, C. Mammucari, V. Romanello, L. Barberi, L. Pietrangelo, A. Fusella, S. Mosole, G. Gherardi, C. Höfer, S. Löffler, N. Sarabon, J. Cvecka, M. Krenn, U. Carraro, H. Kern, F. Protasi, A. Musarò, M. Sandri, R. Rizzuto, Physical exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics, *Phys. Rep.* 4 (2016), <https://doi.org/10.14814/phy2.13005>.
- [148] O.J. Kemi, O. Ellingsen, G.L. Smith, U. Wisloff, Exercise-induced changes in calcium handling in left ventricular cardiomyocytes, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13 (2008) 356–368, <https://doi.org/10.2741/2685>.
- [149] O.J. Kemi, U. Wisloff, Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium, *Acta Physiol. (Oxf. Engl.)* 199 (2010) 425–439, <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02132.x>.
- [150] O.J. Kemi, P.M. Haram, U. Wisloff, Ø. Ellingsen, Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining, *Circulation* 109 (2004) 2897–2904, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129308.04757.72>.
- [151] J.P. French, J.C. Quindry, G.L. Smith, U. Wisloff, Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase function is increased by aerobic interval training, *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. Off. J. Eur. Soc. Cardiol. Work. Groups Epidemiol. Prev. Card. Rehabil. Exerc. Physiol.* 15 (2008) 145–148, <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3282ef4d60>.
- [152] J.P. French, J.C. Quindry, D.J. Falk, J.L. Staib, Y. Lee, K.K.W. Wang, S.K. Powers, Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 (2006) H128–H136, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00739.2005>.
- [153] J. Magalhães, I.O. Gonçalves, J. Lumini-Oliveira, I. Marques-Aleixo, E. Passos, S. Rocha-Rodrigues, N.G. Machado, A.C. Moreira, D. Rizzo, G. Viscor, P.J. Oliveira, J.R. Torrella, A. Ascensão, Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia, *Int. J. Cardiol.* 173 (2014) 40–45, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.02.011>.
- [154] A. Lejay, A.-L. Charles, I. Georg, F. Goupilleau, C. Delay, S. Talha, F. Thaveau, N. Chakfé, B. Geny, Critical limb ischaemia exacerbates mitochondrial dysfunction in ApoE<sup>-/-</sup> mice compared with ApoE<sup>+/+</sup> mice, but N-acetyl cysteine still confers protection, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 58 (2019) 576–582, <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.03.028>.
- [155] M.F. da Silva, A.J. Natali, E. da Silva, G.J. Gomes, B.G. Teodoro, D.N.Q. Cunha, L.R. Drummond, F.R. Drummond, A.G. Moura, F.G. Belfort, A. de Oliveira, L.R.S.C. Maldonado, L.C. Alberici, Attenuation of Ca<sup>2+</sup> + homeostasis, oxidative stress, and mitochondrial dysfunctions in diabetic rat heart: insulin therapy or aerobic exercise? *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md 1985 119 (2015) 148–156, <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00915.2014>.
- [156] G.C. Shore, J.R. Tata, Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria, *J. Cell Biol.* 72 (1977) 714–725, <https://doi.org/10.1083/jcb.72.3.714>.
- [157] Y. Oropeza-Almazán, E. Vázquez-Garza, H. Chapoy-Villanueva, G. Torre-Amione, G. García-Rivas, Small interfering RNA targeting mitochondrial calcium uniporter improves cardiomyocyte cell viability in hypoxia/reoxygenation injury by reducing calcium overload, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) 5750897, <https://doi.org/10.1155/2017/5750897>.
- [158] L.K. Seidlmayer, V.V. Juettner, S. Kettlewell, E.V. Pavlov, L.A. Blatter, E.N. Dedkova, Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca<sup>2+</sup>, ROS, pH, and inorganic polyphosphate, *Cardiovasc. Res.* 106 (2015) 237–248, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv097>.
- [159] T.P. Rasmussen, Y. Wu, M.A. Joiner, O.M. Koval, N.R. Wilson, E.D. Luczak, Q. Wang, B. Chen, Z. Gao, Z. Zhu, B.A. Wagner, J. Soto, M.L. McCormick, W. Kutschke, R.M. Weiss, L. Yu, R.L. Boudreau, E.D. Abel, F. Zhan, D.R. Spitz, G.R. Buettner, L.-S. Song, L.V. Zingman, M.E. Anderson, Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 9129–9134, <https://doi.org/10.1073/pnas.1504705112>.
- [160] T.S. Luongo, J.P. Lambert, A. Yuan, X. Zhang, P. Gross, J. Song, S. Shannughapriya, E. Gao, M. Jain, S.R. Houser, W.J. Koch, J.Y. Cheung, M. Madesh, J.W. Elrod, The mitochondrial calcium uniporter matches energetic supply with cardiac workload during stress and modulates permeability transition, *Cell Rep.* 12 (2015) 23–34, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.017>.
- [161] H. Zhou, S. Wang, S. Hu, Y. Chen, J. Ren, ER-mitochondria microdomains in cardiac ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective, *Front. Physiol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00755>.
- [162] T.J. O’Dell, R.D. Hawkins, E.R. Kandel, O. Arancio, Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 11285–11289.
- [163] R.M. Rapoport, F. Murad, Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP, *Circ. Res.* 52 (1983) 352–357, <https://doi.org/10.1161/01.RES.52.3.352>.
- [164] A. Maiorana, G. O’Driscoll, R. Taylor, D. Green, Exercise and the nitric oxide vasodilator system, *Sports Med.* 33 (2003) 1013–1035, <https://doi.org/10.2165/0007256-200333140-00001>.
- [165] C. Meziat, D. Boulghabra, E. Strock, S. Battault, I. Barnard, G. Walther, C. Reboul, Exercise training restores eNOS activation in the perivascular adipose tissue of obese rats: impact on vascular function, *Nitric Oxide* 86 (2019) 63–67, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.02.009>.
- [166] W. Calvert John, E. Condit Marah, Juan Pablo Aragón, K. Nicholson Chad, F. Moody Bridgette, L. Hood Rebecca, L. Sandler Amy, Susheel Gundewar, R. Seals Douglas, A. Barouch Lili, J. Lefer David, Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of β<sub>3</sub>-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols, *Circ. Res.* 108 (2011) 1448–1458, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241117>.
- [167] C. Farah, A. Kleindienst, G. Bolea, G. Meyer, S. Gayraud, B. Geny, P. Obert,

- O. Cazorla, S. Tanguy, C. Reboul, Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites, *Basic Res. Cardiol.* 108 (2013) 389, <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0389-2>.
- [170] B. Wang, M. Xu, W. Li, X. Li, Q. Zheng, X. Niu, Aerobic exercise protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction and hypertrophy via  $\beta_3$ -AR-nNOS-NO activation, *PLoS One* 12 (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179648>.
- [171] J. Inserte, D. Garcia-Dorado, The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism, *Br. J. Pharmacol.* 172 (2015) 1996–2009, <https://doi.org/10.1111/bph.12959>.
- [172] J. Sun, A.M. Aponte, M.J. Kohr, G. Tong, C. Steenbergen, E. Murphy, Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-Nitrosylation versus sGC/cGMP/PKG signaling? *Free Radic. Biol. Med.* 54 (2013) 105–112, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.005>.
- [173] C. Methner, R. Lukowski, K. Grube, F. Loga, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, F. Hofmann, T. Krieg, Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosylthiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G, *Basic Res. Cardiol.* 108 (2013) 337, <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0337-1>.
- [174] C. Penna, C. Angotti, P. Pagliaro, Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning, *Exp. Biol. Med.* 239 (2014) 647–662, <https://doi.org/10.1177/1535370214522935>.
- [175] J. Sun, E. Murphy, Protein S-nitrosylation and cardioprotection, *Circ. Res.* 106 (2010) 285–296, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209452>.
- [176] E.T. Chouchani, A.M. James, C. Methner, V.R. Pell, T.A. Prime, B.K. Erickson, M. Forkink, G.Y. Lau, T.P. Bright, K.E. Menger, L.M. Fearnley, T. Krieg, M.P. Murphy, Identification and quantification of protein S-nitrosylation by nitrite in the mouse heart during ischemia, *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 14486–14495, <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798744>.
- [177] P.S. Brookes, Y. Yoon, J.L. Robotham, M.W. Anders, S.-S. Sheu, Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287 (2004) C817–C833, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>.
- [178] G. Wang, D.A. Llem, T.M. Vondriska, H.M. Honda, P. Korge, D.M. Pantaleon, X. Qiao, Y. Wang, J.N. Weiss, P. Ping, Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (2005) H1290–H1295, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00796.2004>.
- [179] V. Borutaite, G.C. Brown, S-nitrosylthiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1757 (2006) 562–566, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.02.014>.
- [180] C. Methner, E.T. Chouchani, G. Buonincontri, V.R. Pell, S.J. Sawiak, M.P. Murphy, T. Krieg, Mitochondria selective S-nitrosylation by mitochondria-targeted S-nitrosylthiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts, *Eur. J. Heart Fail.* 16 (2014) 712–717, <https://doi.org/10.1002/ejhf.100>.
- [181] T.A. Prime, F.H. Blaikie, C. Evans, S.M. Nadtochiy, A.M. James, C.C. Dahm, D.A. Vitturi, R.P. Patel, C.R. Hiley, I. Abakumova, R. Requejo, E.T. Chouchani, T.R. Hurd, J.F. Garvey, C.T. Taylor, P.S. Brookes, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, A mitochondria-targeted S-nitrosylthiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* 106 (2009) 10764–10769, <https://doi.org/10.1073/pnas.0903250106>.
- [182] J.D. Erusalimsky, S. Moncada, Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 2524–2531, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151167>.
- [183] M.J. Kohr, A.M. Aponte, J. Sun, G. Wang, E. Murphy, M. Gucsek, C. Steenbergen, Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300 (2011) H1327–H1335, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00997.2010>.
- [184] S.-I. Bibili, A. Papapetropoulos, E.K. Iliodromitis, A. Daiber, V. Randriamboavonjy, S. Steven, P. Brouckaert, A. Chatzianastasiou, K.E. Kypreos, D.J. Hausenloy, I. Fleming, I. Andreadou, Nitroglycerine limits infarct size through S-nitrosylation of cyclophilin D: a novel mechanism for an old drug, *Cardiovasc. Res.* 115 (2019) 625–636, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy222>.
- [185] Z. Laczka, E. Pankotai, D.W. Busija, Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies, *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14 (2009) 4436–4443.
- [186] S. Gao, J. Chen, S.V. Brodsky, H. Huang, S. Adler, J.H. Lee, N. Dhadwal, L. Cohen-Gould, S.S. Gross, M.S. Goligorsky, Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane A PENTABASIC amino acid sequence IN the autoinhibitory domain OF eNOS targets A proteinase K-cleavable peptide ON the cytoplasmic face OF mitochondria, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 15968–15974, <https://doi.org/10.1074/jbc.M308504200>.
- [187] J. Sun, M.J. Kohr, T. Nguyen, A.M. Aponte, P.S. Connelly, S.G. Esfahani, M. Gucsek, M.P. Daniels, C. Steenbergen, E. Murphy, Disruption of caveolae blocks ischemic preconditioning-mediated S-nitrosylation of mitochondrial proteins, *Antioxidants Redox Signal.* 16 (2012) 45–56, <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3844>.
- [188] C. Farah, C. Reboul, NO better way to protect the heart during ischemia-reperfusion: to be in the right place at the right time, *Front. Pediatr.* 3 (2015), <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00006>.
- [189] Z. Tatarikova, M. Kovalska, M.K. Sivoonova, P. Racay, J. Lehotsky, P. Kaplan, Tyrosine nitration of mitochondrial proteins during myocardial ischemia and reperfusion, *J. Physiol. Biochem.* 75 (2019) 217–227, <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00683-7>.
- [190] A. Kleindienst, S. Battault, E. Belaidi, S. Tanguy, M. Rossetin, D. Boulghobra, G. Meyer, S. Gayraud, G. Walther, B. Geny, G. Durand, O. Cazorla, C. Reboul, Exercise does not activate the  $\beta_3$  adrenergic receptor-eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice, *Basic Res. Cardiol.* 111 (2016) 40, <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0559-0>.
- [191] A.R. Hall, N. Burke, R.K. Dongworth, D.J. Hausenloy, Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 1890–1906, <https://doi.org/10.1111/bph.12516>.
- [192] J.M. Suárez-Rivero, M. Villanueva-Paz, P. de la Cruz-Ojeda, M. de la Mata, D. Corán, M. Oropesa-Ávila, I. de Laveria, M. Álvarez-Córdoba, R. Luzón-Hidalgo, J.A. Sánchez-Alcázar, Mitochondrial dynamics in mitochondrial diseases, *Diseases* 5 (2016), <https://doi.org/10.3390/diseases5010001>.
- [193] N.R. Brady, A. Hamacher-Brady, R.A. Gottlieb, Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 667–678, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.011>.
- [194] C. Manechote, S. Palee, S. Kerdphoo, T. Jaiwongkam, S.C. Chattipakorn, N. Chattipakorn, Differential temporal inhibition of mitochondrial fission by Mdivi-1 exerts effective cardioprotection in cardiac ischemia/reperfusion injury, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 132 (2018) 1669–1683, <https://doi.org/10.1042/CS20180510>.
- [195] W.W. Sharp, Y.H. Fang, M. Han, H.J. Zhang, Z. Hong, A. Banathy, E. Morrow, J.J. Ryan, S.L. Archer, Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28 (2014) 316–326, <https://doi.org/10.1096/fj.12-226225>.
- [196] C. Vázquez-Trincado, I. García-Carvajal, C. Pennanen, V. Parra, J.A. Hill, B.A. Rothmel, S. Lavandero, Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease, *J. Physiol.* 594 (2016) 509–525, <https://doi.org/10.1113/jp271301>.
- [197] S.-B. Ong, S. Subrayan, S.Y. Lim, D.M. Yellon, S.M. Davidson, D.J. Hausenloy, Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury, *Circulation* 121 (2010) 2012–2022, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906610>.
- [198] S.-B. Ong, A.B. Gustafsson, New roles for mitochondria in cell death in the re-perfused myocardium, *Cardiovasc. Res.* 94 (2012) 190–196, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr312>.
- [199] Y. Dong, V.V.R. Undyala, K. Przyklenk, Inhibition of mitochondrial fission as a molecular target for cardioprotection: critical importance of the timing of treatment, *Basic Res. Cardiol.* 111 (2016) 59, <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0578-x>.
- [200] M. Ding, J. Feng, Z. Li, F. Fu, Inhibition of drp1-mediated mitochondrial fission protects diabetic heart against ischemia-reperfusion injury, *Diabetes* 67 (2018) 408–P, <https://doi.org/10.2337/db18-408-P>.
- [201] W.W. Sharp, D.G. Beiser, Y.H. Fang, M. Han, L. Piao, J. Varughese, S.L. Archer, Inhibition of the mitochondrial fission protein Drp1 improves survival in a murine cardiac arrest model, *Crit. Care Med.* 43 (2015) e38–e47, <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000817>.
- [202] D. Stutzman, C. Schmidgall, I. Benjamin, Q. Chen, C. Hatcher, R. Barsotti, L. Young, Mdivi-1, a novel mitochondrial fission inhibitor, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury, *FASEB J.* 29 (2015), [https://doi.org/10.1096/faseb.29.1\\_supplement.1049.1](https://doi.org/10.1096/faseb.29.1_supplement.1049.1) 1049.1.
- [203] J. Hom, T. Yu, Y. Yoon, G. Porter, S.-S. Sheu, Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat ventricular myocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 913–921, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.018>.
- [204] Q. Chen, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnfsky, Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 294 (2008) C460–C466, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00211.2007>.
- [205] E.Y. Plotnikov, A.K. Vasileva, A.A. Arkhangel'skaya, I.B. Pevzner, V.P. Skulachev, D.B. Zorov, Interrelations of mitochondrial fragmentation and cell death under ischemia/reoxygenation and UV-irradiation: protective effects of SKQ1, lithium ions and insulin, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3117–3124, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.002>.
- [206] E. Teixeira de Lemos, J. Oliveira, J. Páscoa Pinheiro, F. Reis, Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: benefits in type 2 diabetes mellitus, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012), <https://doi.org/10.1155/2012/741545>.
- [207] C. Simioni, G. Zauli, A.M. Martelli, M. Vitale, G. Sacchetti, A. Gonelli, L.M. Neri, Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging, *Oncotarget* 9 (2018) 17181–17198, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24729>.
- [208] H.-K. Jiang, Y.-H. Wang, L. Sun, X. He, M. Zhao, Z.-H. Feng, X.-J. Yu, W.-J. Zang, Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 5304–5322, <https://doi.org/10.3390/ijms15045304>.
- [209] G. Twig, A. Elorza, A.J.A. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, O.S. Shirihai, Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy, *EMBO J.* 27 (2008) 433–446, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>.
- [210] D.A. Kubli, X. Zhang, Y. Lee, R.A. Hanna, M.N. Quinsay, C.K. Nguyen, R. Jimenez, S. Petrosyan, A.N. Murphy, A.B. Gustafsson, Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 915–926, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411363>.
- [211] H.K. Siddall, D.M. Yellon, S.-B. Ong, U.A. Mukherjee, N. Burke, A.R. Hall, P.R. Angelova, M.H.R. Ludtmann, E. Deas, S.M. Davidson, M.M. Mocanu, D.J. Hausenloy, Loss of PINK1 increases the heart's vulnerability to ischemia-reperfusion injury, *PLoS One* 8 (2013) e62400, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062400>.

- [212] A. Hamacher-Brady, N.R. Brady, R.A. Gottlieb, Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29776–29787, <https://doi.org/10.1074/jbc.M603783200>.
- [213] Y. Lee, I. Kwon, Y. Jang, W. Song, L.M. Cosio-Lima, M.H. Rolsch, Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection, *J. Physiol. Sci.* 67 (2017) 639–654, <https://doi.org/10.1007/s12576-017-0555-7>.
- [214] Y. Yuan, S.-S. Pan, Parkin mediates mitophagy to participate in cardioprotection induced by late exercise preconditioning but Bnip3 does not, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 71 (2018) 303, <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000572>.
- [215] A.P. West, G.S. Shadel, S. Ghosh, Mitochondria in innate immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 389–402, <https://doi.org/10.1038/nri2975>.
- [216] F. Arslan, D.P. de Kleijn, G. Pasterkamp, Innate immune signaling in cardiac ischemia, *Nat. Rev. Cardiol.* 8 (2011) 292–300, <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.38>.
- [217] N.G. Frangogiannis, Regulation of the inflammatory response in cardiac repair, *Circ. Res.* 110 (2012) 159–173, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162>.
- [218] M. Gleeson, N.C. Bishop, D.J. Stensel, M.R. Lindley, S.S. Mastana, M.A. Nimmo, The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 607–615, <https://doi.org/10.1038/nri3041>.
- [219] L.J. Eddy, D.V. Goeddel, G.H.W. Wong, Tumor necrosis factor- $\alpha$  pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184 (1992) 1056–1059, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)90698-k](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)90698-k).
- [220] J.C. Boyd, C.A. Simpson, M.E. Jung, B.J. Gurd, Reducing the intensity and volume of interval training diminishes cardiovascular adaptation but not mitochondrial biogenesis in overweight/obese men, *PLoS One* 8 (2013) e68091, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068091>.
- [221] W.-K. Chen, Y.-L. Tsai, M.A. Shibu, C.-Y. Shen, S.N. Chang-Lee, R.-J. Chen, C.-H. Yao, B. Ban, W.-W. Kuo, C.-Y. Huang, Exercise training augments Sirt1-signaling and attenuates cardiac inflammation in D-galactose induced-aging rats, *Aging* 10 (2018) 4166–4174, <https://doi.org/10.18632/aging.101714>.
- [222] M.-Y. Liao, J.-K. Lai, M.-Y.-P. Kuo, R.-M. Lu, C.-W. Lin, P.-C. Cheng, K.-H. Liang, H.-C. Wu, An anti-EpCAM antibody EpAb2-6 for the treatment of colon cancer, *Oncotarget* 6 (2015) 24947–24968, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4453>.
- [223] H.K. Eltzschig, T. Eckle, Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation, *Nat. Med.* 17 (2011) 1391–1401, <https://doi.org/10.1038/nm.2507>.
- [224] P. Mukhopadhyay, B. Horváth, Z. Zsengeller, S. Bátkai, Z. Cao, M. Kechrid, E. Holovac, K. Erdélyi, G. Tanchian, L. Liaudet, I.E. Stillman, J. Joseph, B. Kalyanaraman, P. Pacher, Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially-targeted antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1123–1138, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.036>.
- [225] N. Otake, R. Shibata, K. Ohashi, Y. Uemura, T. Kambara, T. Enomoto, H. Ogawa, M. Ito, H. Kawanishi, S. Maruyama, Y. Joki, Y. Fujikawa, S. Narita, K. Unno, Y. Kawamoto, T. Murate, T. Murohara, N. Ouchi, Myonectin is an exercise-induced myokine that protects the heart from ischemia-reperfusion injury, *Circ. Res.* 123 (2018) 1326–1338, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313777>.
- [226] G. Sharma, M. Sahu, A. Kumar, A.K. Sharma, V. Aeri, D.P. Katara, Temporal dynamics of pre and post myocardial infarcted tissue with concomitant preconditioning of aerobic exercise in chronic diabetic rats, *Life Sci.* 225 (2019) 79–87, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.077>.
- [227] T. Tuon, P.S. Souza, M.F. Santos, F.T. Pereira, G.S. Pedrosa, T.F. Luciano, C.T. De Souza, R.C. Dutra, P.C.L. Silveira, R.A. Pinho, Physical training regulates mitochondrial parameters and neuroinflammatory mechanisms in an experimental model of Parkinson's disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2015) 261809, <https://doi.org/10.1155/2015/261809>.
- [228] B.L. Tang, Sirt1 and the mitochondria, *Mol. Cell* 39 (2016) 87–95, <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2318>.
- [229] S. Ma, J. Feng, R. Zhang, J. Chen, D. Han, X. Li, B. Yang, X. Li, M. Fan, C. Li, Z. Tian, Y. Wang, F. Cao, SIRT1 activation by resveratrol alleviates cardiac dysfunction via mitochondrial regulation in diabetic cardiomyopathy mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) 4602715, <https://doi.org/10.1155/2017/4602715>.
- [230] C.C.W. Chen, A.T. Erlich, D.A. Hood, Role of Parkin and endurance training on mitochondrial turnover in skeletal muscle, *Skeletal Muscle* 8 (2018), <https://doi.org/10.1186/s13395-018-0157-y>.
- [231] M.M. Michelsen, N.B. Støttrup, M.R. Schmidt, B. Løfgren, R.V. Jensen, M. Tropak, E.J. St-Michel, A.N. Redington, H.E. Bøtker, Exercise-induced cardioprotection is mediated by a bloodborne, transferable factor, *Basic Res. Cardiol.* 107 (2012) 260, <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0260-x>.
- [232] S. Zhang, N. Wang, J. Xu, Q. Gao, G. Lin, I.C. Bruce, Q. Xia, Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning, *Anesthesiology* 105 (2006) 550–556, <https://doi.org/10.1097/0000542-200609000-00019>.
- [233] T. Suvorova, M.M. Cortese-Krott, Exercise-induced cardioprotection via eNOS: a putative role of red blood cell signaling, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018) 4457–4474, <https://doi.org/10.2174/0929867325666180307112557>.
- [234] C. Fiuza-Luces, A. Santos-Lozano, M. Joyner, P. Carrera-Bastos, O. Picazo, J.L. Zugaza, M. Izquierdo, L.M. Ruilope, A. Lucia, Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors, *Nat. Rev. Cardiol.* 15 (2018) 731–743, <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0065-1>.
- [235] G.R. McGinnis, C. Ballmann, B. Peters, G. Nanayakkara, M. Roberts, R. Amin, J.C. Quindry, Interleukin-6 mediates exercise preconditioning against myocardial ischemia reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308 (2015) H1423–H1433, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00850.2014>.
- [236] N. Smart, M.H. Mojte, D.S. Latchman, M.S. Marber, M.R. Duchon, R.J. Heads, IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 164–177, <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.08.017>.
- [237] S. Qiu, X. Cai, Z. Sun, U. Schumann, M. Zögel, J.M. Steinacker, Chronic exercise training and circulating irisin in adults: a meta-analysis, *Sports Med. Auckl. NZ.* 45 (2015) 1577–1588, <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0293-4>.
- [238] H. Wang, Y.T. Zhao, S. Zhang, P.M. Dubielecka, J. Du, N. Yano, Y.E. Chin, S. Zhuang, G. Qin, T.C. Zhao, Irisin plays a pivotal role to protect the heart against ischemia and reperfusion injury, *J. Cell. Physiol.* 232 (2017) 3775–3785, <https://doi.org/10.1002/jcp.25857>.
- [239] Y. Bei, T. Xu, D. Lv, P. Yu, J. Xu, L. Che, A. Das, J. Tigges, V. Toxavidis, I. Ghiran, R. Shah, Y. Li, Y. Zhang, S. Das, J. Xiao, Exercise-induced circulating extracellular vesicles protect against cardiac ischemia-reperfusion injury, *Basic Res. Cardiol.* 112 (2017) 38, <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0628-z>.
- [240] Y. Wang, M. Tian, C. Mi, K. Chen, Y. Ji, L. Wang, J. Zhang, K. Cheng, Exercise protects the heart against myocardial infarction through upregulation of miR-1192, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 521 (2020) 1061–1069, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.019>.
- [241] Z. Hou, X. Qin, Y. Hu, X. Zhang, G. Li, J. Wu, J. Li, J. Sha, J. Chen, J. Xia, L. Wang, F. Gao, Longterm exercise-derived exosomal miR-342-5p: a novel exercine for cardioprotection, *Circ. Res.* 124 (2019) 1386–1400, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314635>.
- [242] B.-L. Wang, H. Jin, X.-Q. Han, Y. Xia, N.-F. Liu, Involvement of brain-derived neurotrophic factor in exercise-induced cardioprotection of post-myocardial infarction rats, *Int. J. Mol. Med.* 42 (2018) 2867–2880, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3841>.
- [243] A. Crisafulli, F. Melis, F. Tocco, U.M. Santoboni, C. Lai, G. Angioy, L. Lorrain, G. Pittau, A. Concu, P. Pagliaro, Exercise-induced and nitroglycerin-induced myocardial preconditioning improves hemodynamics in patients with angina, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (2004) H235–H242, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00989.2003>.

### A retenir :

- + La mitochondrie est un organite cible des différentes stratégies de cardioprotection.**
- + L'établissement d'un cercle vicieux entre accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale et surproduction d'ERO semble être décisif dans l'activation du mPTP au cours de l'IR.**
- + Le ciblage des EROmt avec des antioxydants spécifiques semble pouvoir être une stratégie efficace afin de limiter la sévérité des lésions de reperfusion.**
- + La voie eNOS/NO/SNO joue un rôle clé dans la cardioprotection induite par l'exercice physique. Son impact au niveau mitochondrial ne semble à ce jour pas clairement établi.**

# **OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE**

## Objectifs du travail de thèse

Compte tenu du rôle clé de la mitochondrie dans les lésions de reperfusion, il semble important de limiter l'ouverture du mPTP en prévenant l'augmentation de la concentration diastolique en  $\text{Ca}^{2+}$  et/ou en limitant la production massive d'ERO au cours de la reperfusion. Ainsi, il semble intéressant de pouvoir agir grâce à différents procédés sur le cercle vicieux entre ces deux paramètres afin de limiter les lésions au cours de l'IR.

La revue de littérature a permis de mettre en évidence l'efficacité d'une supplémentation en antioxydants ciblant directement la mitochondrie dans la limitation de la production d'ERO au cours de la reperfusion post-ischémique. Cependant, à ce jour, les seuls antioxydants rapportés comme permettant de cibler la mitochondrie sont des antioxydants de synthèse. Il n'y a aucune raison de penser que des molécules possédant des propriétés chimiques similaires, leur permettant de cibler la mitochondrie, ne soient pas également présentes dans la nature. Dans ce contexte et en collaboration avec la société Naturex, leader mondial des ingrédients naturels nous avons pu identifier un antioxydant naturel, la sinapine, dont les propriétés chimiques (antioxydant cationique, ester de choline de l'acide sinapique), pourraient lui permettre de cibler la mitochondrie. En effet, la sinapine aussi appelée sinapoycholine-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamoyl-choline est un composé phénolique présent en grande quantité dans les plantes de la famille des *Brassicaceae*. Elle a été isolée pour la première fois à partir de graines de moutarde, mais on la retrouve en grande quantité dans le colza (environ  $10 \text{ mg.g}^{-1}$ ) (Yates et al., 2019) ainsi que dans certaines épices, agrumes, baies et céréales. La sinapine est généralement produite dans l'enveloppe externe des graines oléagineuses. Cette molécule semble prometteuse puisqu'elle est reconnue pour ses propriétés antioxydantes (Chen, 2016; Yates et al., 2019). L'acide sinapique est un antioxydant déjà bien décrit dans la littérature scientifique (Chen, 2016; Nithya and Subramanian, 2017; Siger et al., 2013). La sinapine, possède le même groupement phénol associé à une amine quaternaire lui conférant ainsi une charge positive. Ainsi, les différents éléments de la structure chimique de la sinapine suggèrent que celle-ci pourrait avoir un fort tropisme mitochondrial et ainsi être capable de cibler le stress oxydant au niveau mitochondrial au cours de l'IR.

## Objectif 1

Ainsi le premier objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer la manière dont la sinapine, un antioxydant naturel cationique ciblant la mitochondrie, était capable de limiter la production d'ERO au cours d'un syndrome d'IR myocardique (Etude n°1).

Dans un second temps, nous nous sommes centrés sur les effets cardioprotecteurs de l'exercice physique. En effet, il est aujourd'hui admis que l'activation de la eNOS et que la signalisation NO/SNO permet en partie d'expliquer la cardioprotection induite par l'exercice. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents demeurent encore mal compris. Bien que l'impact du NO sur la fonction mitochondriale soit bien décrit, à ce jour l'impact de l'exercice sur la biodisponibilité mitochondriale du NO n'a jamais été établi.

## Objectif 2

Ainsi le deuxième objectif de ce travail de thèse était d'évaluer comment la modification de la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial participe à la cardioprotection induite par l'exercice physique (Etude n°2).

# **MATERIELS & METHODES**

## Préambule

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC, EA4278) de l'Université d'Avignon. Néanmoins, une partie des expérimentations de **l'ETUDE 1** sur cardiomyocytes isolés ont été conduites au sein du laboratoire INSERM U-1046 Physiologie et Médecine Expérimentale Cœur et Muscles (Montpellier, dirigé par le Professeur Jacques Mercier sous la responsabilité du DR Olivier Cazorla), dans le cadre d'une bourse de mobilité financée par le Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire.

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la directive 2010/63 EU du parlement européen sur l'utilisation des animaux de laboratoire (comité d'éthique N° CEEA-00322.03).

***Ce travail est organisé en 2 études indépendantes dont les spécificités des procédures expérimentales seront précisées et exposées distinctement, excepté les techniques communes aux deux études.***

## I. Populations expérimentales

Les animaux de l'**ETUDE 1** ont été hébergés soit au sein de l'animalerie du PHYMEDEXP, (Inserm, CNRS, U-1046, Montpellier) soit au sein de l'animalerie de l'EA4278 (UFR STS, Avignon Université). Pour l'**ETUDE 2**, tous les animaux ont été hébergés dans l'animalerie de l'EA 4278. La totalité des animaux de ce travail de thèse ont été exposés à des cycles jour/nuit de 12h à température contrôlée et ont disposé d'un accès *ad libitum* en eau et nourriture. Enfin tous les animaux ont bénéficié d'un enrichissement de leur milieu de vie. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la directive 2010/63 UE du parlement européen sur l'utilisation des animaux de laboratoire (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale, n° CEEA-00322.03 pour l'**ETUDE 1** ; n°APAFIS#3487-2016010813443457 pour l'**ETUDE 2**).

### 1. Etude 1 : La sinapine, un antioxydant naturel permettant de réduire le stress oxydant mitochondrial au cours d'une ischémie cardiaque

#### 1.1. Groupes expérimentaux

Dans cette première étude, en collaboration avec la société Naturex et le PHYMEDEXP, nous sommes intéressés aux propriétés antioxydantes d'un phénol cationique, la sinapine. Afin d'évaluer sa capacité à aller cibler la mitochondrie et à limiter ainsi la production d'ERO au cours de l'IR, 78 rats mâles Wistar ont été utilisés pour cette étude (12 semaines, n= 78, poids =  $361 \pm 4$  g, Laboratoire Janvier).

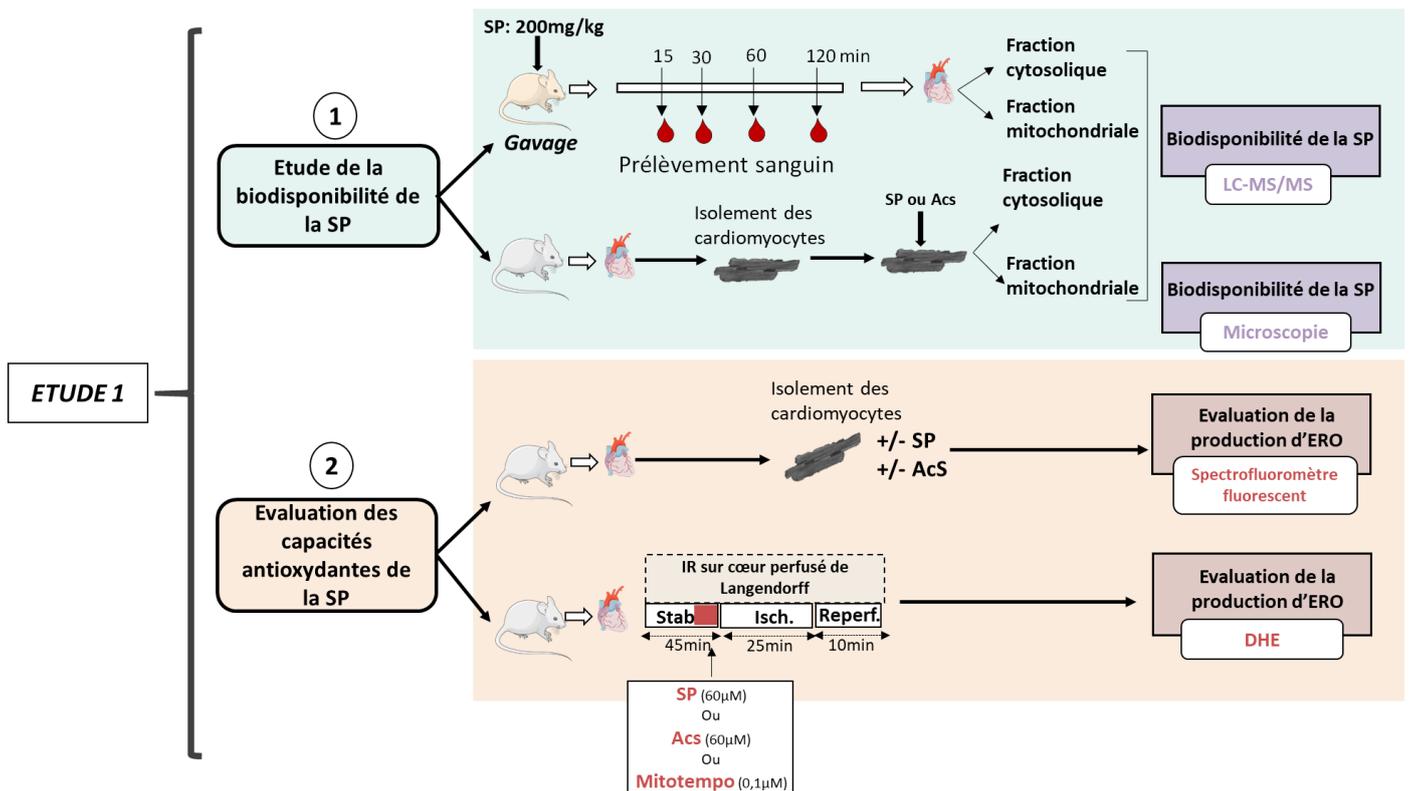
#### 1.2. Les composés utilisés

La sinapine (SP) a été commandée chez ChemSpider ( $C_{16}H_{24}NO_5$ , masse molaire : 310,365 g.mol<sup>-1</sup>) et l'acide sinapique (ACs), utilisé tout au long de l'étude comme contrôle négatif (même propriété

antioxydante que la sinapine mais sans groupement choline) a été commandé chez Sigma Adrich ( $C_{11}H_{12}O_5$ , masse molaire : 225,21 g.mol). Le MitoTempo, utilisé comme un antioxydant de référence afin de cibler le stress oxydant mitochondrial, a été commandé chez Santa Cruz Biotechnology.

### 1.3. Design expérimental

Afin d'évaluer la capacité de la sinapine à cibler le stress oxydant mitochondrial, nous avons évalué **1)** sa biodisponibilité au niveau plasmatique ; ainsi qu'au niveau des fractions cytosolique et mitochondriale. En **2)** nous avons évalué l'impact de cette molécule sur le stress oxydant cellulaire et cardiaque (*Figure 24-(1) et (2)*).



**Figure 24** : Design expérimental de l'ETUDE n°1.

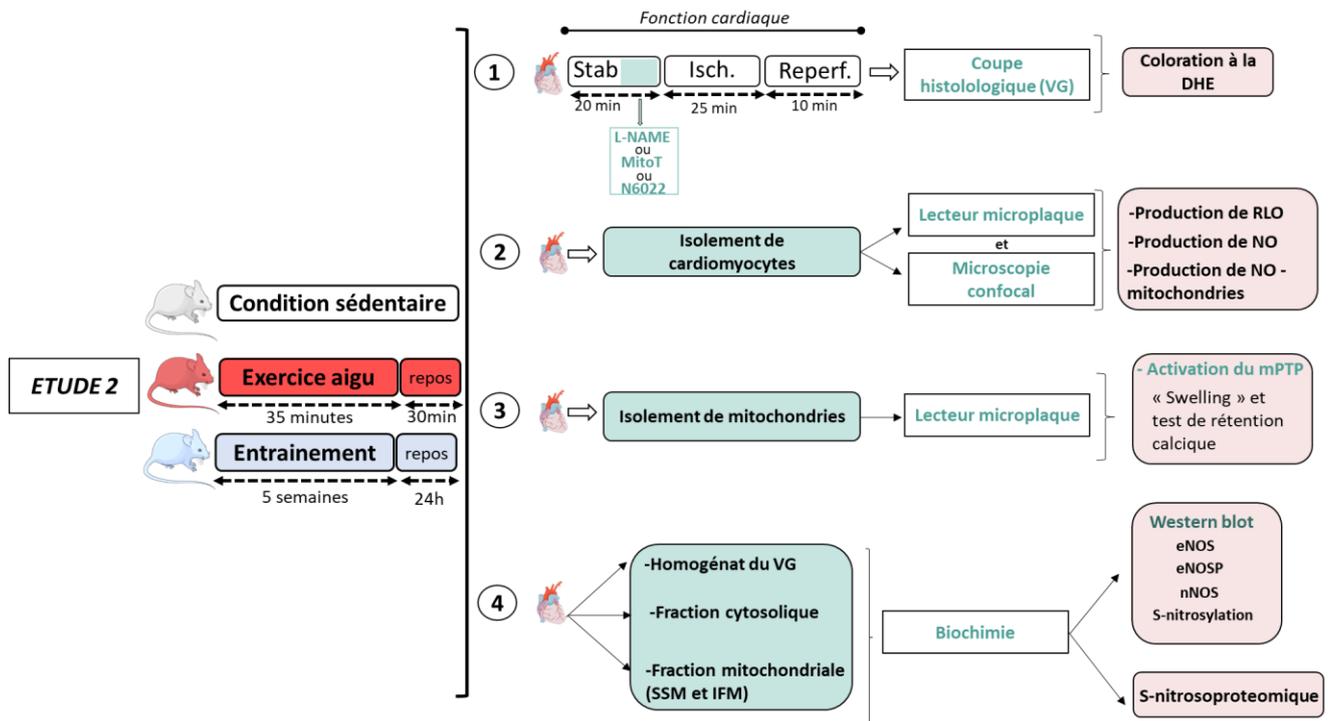
## 2. Etude 2 : Conditionnement des mitochondries cardiaques par l'exercice physique : rôle du NO ?

### 2.1. Groupes expérimentaux

Dans cette seconde étude, nous nous sommes intéressés aux effets cardioprotecteurs de l'exercice physique sur les mitochondries cardiaques et au rôle de la signalisation eNOS/NO/SNO dans ce phénomène. Pour cela, des rats Wistars mâles âgés de 12 semaines (Laboratoire Janvier) ont été utilisés. Afin d'évaluer l'impact de l'exercice physique, les rats ont été répartis aléatoirement en 3 groupes expérimentaux : un groupe de rats sédentaires (**Sed**) ; un groupe de rats entraînés sur tapis roulant motorisé, à raison de 5 jours par semaine, durant 5 semaines (**Ex-Tr**), et enfin un groupe soumis à une seule session d'exercice de 35 minutes avant d'être sacrifiés (**A-Ex**).

### 2.2. Organisation des expérimentations

L'objectif de cette 2<sup>ème</sup> **ETUDE** de thèse était de mieux comprendre comment l'interaction entre la eNOS et les mitochondries contribue à expliquer la cardioprotection induite par l'exercice physique (*Figure 25*). Pour cela, l'impact de l'entraînement physique sur l'expression de la eNOS, la production de NO et la S-nitrosylation des protéines mitochondriales ont été évalués en utilisant respectivement le Western Blot (*Figure 25 (4)*), la microscopie confocale (*Figure 25 (2)*) et la s-nitrosoprotéomique (*Figure 25 (4)*). La capacité de rétention calcique mitochondriale a été évaluée sur des mitochondries isolées (*Figure 25 (3)*). Enfin, la production d'ERO a été mesurée 10 minutes après l'IR avec des sondes fluorescentes spécifiques du stress oxydant tissulaire et mitochondrial (Dihydroéthidium et MitoSoxRed) (*Figure 25 (1) et (2)*).



**Figure 25** : Design expérimental de l'ETUDE n°2.

## 2.3. Protocole d'exercice physique

### 2.3.1. Entraînement physique

Afin d'évaluer l'effet potentiellement cardioprotecteur de l'activité physique sur le cœur et les mitochondries cardiaques, certains rats (groupe **Ex-Tr**) ont été soumis à un exercice physique sur tapis roulant motorisé (Ugo basile®, choc des intensités : 1,5 mV, fréquence : 3 Hz) en respectant des modalités d'entraînement spécifiques (5 semaines, 5 jours/semaine, 45minutes/séance, 60% de la vitesse maximale aérobie (VMA)) telles que préalablement décrites et caractérisées au sein du LaPEC (Farah et al., 2013, 2017).

Durant toute la durée du protocole, chaque séance débutait par un échauffement de 5 minutes à  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  avec une augmentation progressive de la vitesse, jusqu'à atteindre celle requise pour l'entraînement (*Tableau 1*). L'intensité d'effort était estimée tout au long du protocole à environ 60% de la VMA des animaux. Les séances d'entraînement étaient pratiquées en environnement standard

d'animalerie. Un test de VMA était réalisé au cours de la 5<sup>ème</sup> semaine d'exercice (\* $p < 0,05$ , Sed  $36 \pm 1,58$  et Ex-Tr  $46,25 \pm 1,31$ ). Afin de s'affranchir des effets aigus de l'exercice, les rats étaient sacrifiés 24 h après la dernière session d'entraînement.

Semaines	ECHAUFFEMENT		EXERCICE	
	Vitesse m/min	Temps (min)	Vitesse m/min	Temps (min)
1	15	5	18	30
2	15	5	20	35
3	15	5	22	40
4	15	5	24	45
5	15	5	24	45

**Tableau 1** : Protocole d'entraînement utilisé au cours de l'ETUDE n°2.

### 2.3.2. Exercice aigu

Afin d'évaluer l'impact d'un exercice aigu, certains rats ont été soumis à un seul exercice physique (course sur tapis) de 35 minutes à environ 60 % de leur capacité maximale aérobie ( $20 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Les rats sont sacrifiés au cours des 30 minutes suivant l'arrêt de l'exercice.

## II. Evaluation des paramètres biologiques et physiologiques

### 1. Vitesse Maximale Aérobie (Etude 2)

La VMA a été déterminée afin d'évaluer l'efficacité de l'entraînement. Pour cela, l'ensemble des animaux de l'ETUDE 2 a été soumis à un test d'effort maximal, de type triangulaire au début et à la fin du protocole d'entraînement. Le test était effectué au lendemain de la fin du protocole d'exercice physique. Le test de VMA débutait par un échauffement de 3 minutes à  $10 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$ , puis la vitesse était augmentée de  $4 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  toutes les 90 secondes jusqu'à atteindre 85-90% de la VMA suspectée. Pour finir, des incréments de  $1 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  toutes les 60 secondes étaient effectuées jusqu'à ce que

l'animal ne soit plus en mesure de maintenir la vitesse de course (en accord avec les précédentes études réalisées au sein du LaPEC (Reboul et al., 2005)). Le test était immédiatement stoppé pour tout animal montrant de trop grands signes de fatigue en conformité avec les règles d'éthiques fixées par the Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols.

## 2. Ischémie Reperfusion sur cœur isolé perfusé de Langendorff

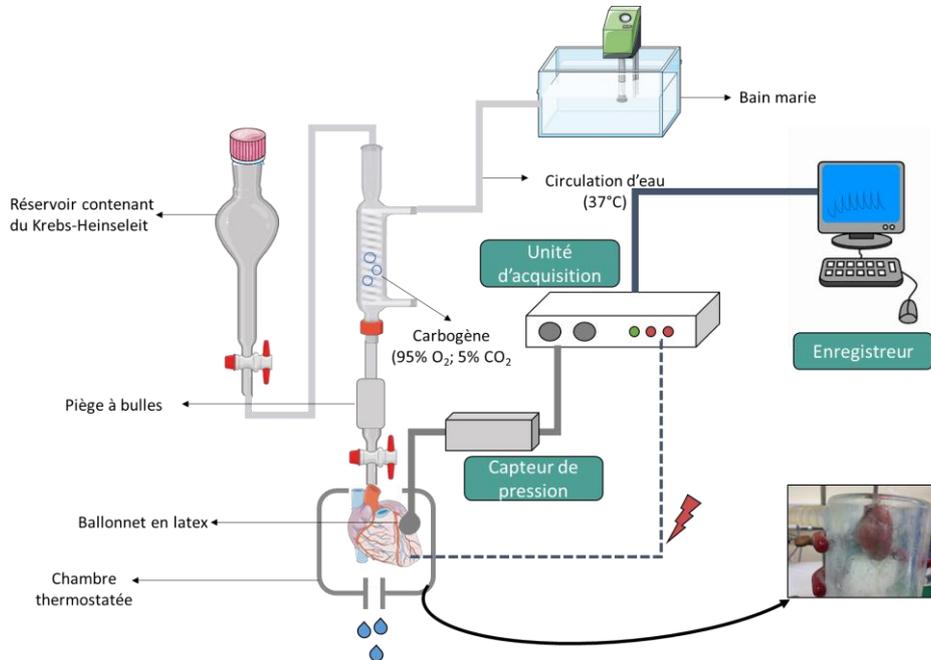
Afin d'évaluer l'impact de la sinapine (**ETUDE 1**) ou de l'exercice physique (**ETUDE 2**) sur la production d'ERO dans les premières minutes de la reperfusion post-ischémique, un protocole d'IR était réalisé sur cœur isolé perfusé de Langendorff.

### 2.1. Protocole d'ischémie reperfusion

Dans les **ETUDES 1 et 2** les rats étaient dans un premier temps anesthésiés par une injection intraperitonéale de pentobarbital sodique (120 mg/kg ; ip, Doléthal Vetoquinol). Par la suite, une injection par voie intra-veineuse d'héparine sodique (Fisher Scientific), à la dose de 300 UI.kg<sup>-1</sup> est réalisée afin de prévenir la formation de caillots sanguins au moment du prélèvement de l'organe. Une thoracotomie était ensuite réalisée et le cœur était prélevé puis placé dans une solution de Krebs-Henseleit (en mM : NaCl 118 ; NaHCO<sub>3</sub> 25 ; KCl 4,7 ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 ; Glucose 11,1 ; CaCl<sub>2</sub> 1,25 ; pH 7,4) à 4 °C afin de stopper les contractions cardiaques spontanées. Une fois nettoyé des tissus périphériques, le cœur était canulé par l'aorte sur un poste de cœur isolé perfusé de Langendorff de manière rétrograde à une pression constante de 80 mmHg (*Figure 26*) avec une solution de Krebs Henseleit, chauffée à 37 °C et bullée au carbogène (95% O<sub>2</sub> ; 5% CO<sub>2</sub>).

Suite à cela, afin de stopper les dépolarisations autonomes cardiaques, les atriums étaient retirés et le nœud auriculo-ventriculaire était délicatement lésé par compression. Un ballonnet en latex rempli d'eau, relié à un capteur de pression (MP35, Biopac System Inc) était ensuite inséré dans le ventricule gauche (VG) afin d'enregistrer les cinétiques de contractions myocardiques. Une stimulation électrique (BSL MP35 SS58L, 3V) du cœur a permis de fixer la fréquence de contraction à 300 battements par minute. Enfin, le volume du ballonnet est réglé afin d'obtenir une pression télédiastolique de 5 mmHg. Une fois cette procédure réalisée, le cœur était alors maintenu à l'état

stable pendant 20 minutes avant d'être perfusé ou non avec différents agents pharmacologiques dans les conditions décrites sur la *Figure 27 (ETUDE n°1)* ou *Figure 28 (ETUDE n°2)*.



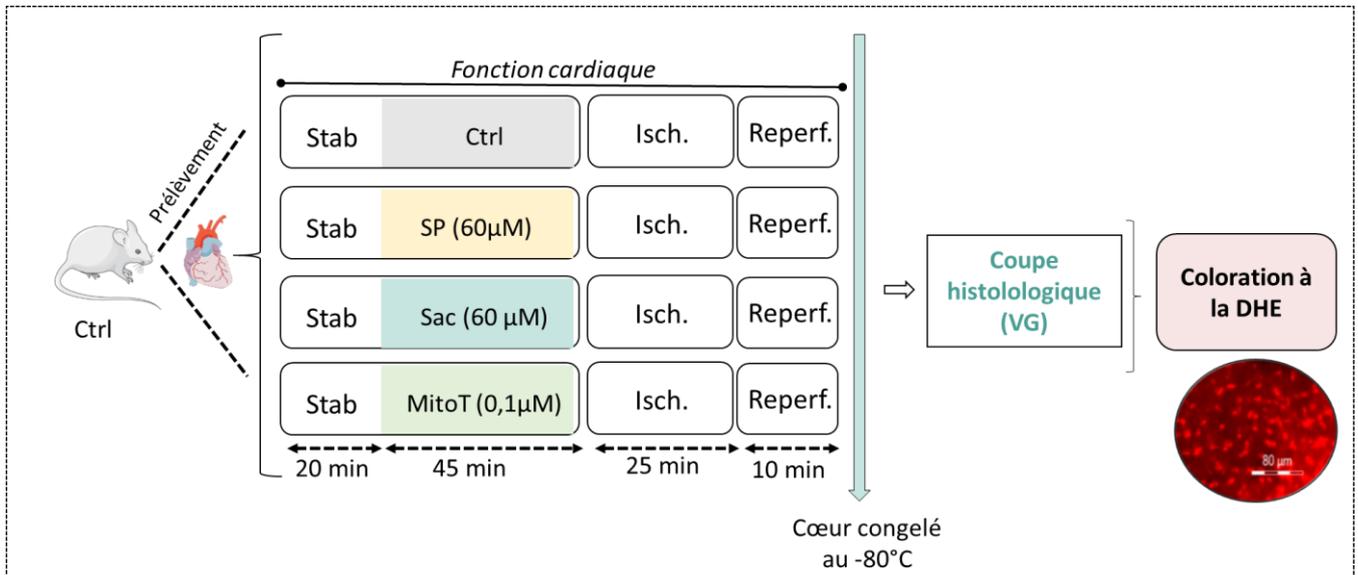
**Figure 26** : Poste de cœur isolé de Langendorff.

Après 20 minutes de stabilisation, les cœurs étaient perfusés ou non avec différents agents pharmacologiques (*Figure 27* pour protocole de l'**ETUDE 1** et *Figure 28* pour protocole de l'**ETUDE 2**). Une ischémie globale et totale était ensuite pratiquée pendant 25 minutes en interrompant totalement la perfusion cardiaque. Par la suite, le cœur était reperfusé pendant 10 minutes. A la fin des 10 minutes de reperfusion, le cœur était rapidement prélevé, placé dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature) et congelé à l'azote liquide afin de pouvoir évaluer a posteriori la production d'ERO (*voir II/2/2.3*).

### 2.1.1. Protocole ETUDE 1

Afin d'évaluer si la sinapine est capable de prévenir la production d'ERO au cours d'un stress d'IR, certains cœurs ont été perfusés durant 45 minutes avec 60  $\mu$ M de sinapine (SP, ChemSpider). L'effet potentiellement cardioprotecteur de la sinapine a été comparé à celui de l'acide sinapique (AcS,

60  $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich) et à celui d'un antioxydant de synthèse ciblant le stress oxydant mitochondrial, le MitoTempo (mitoT, 0.1  $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich) (Figure 27).

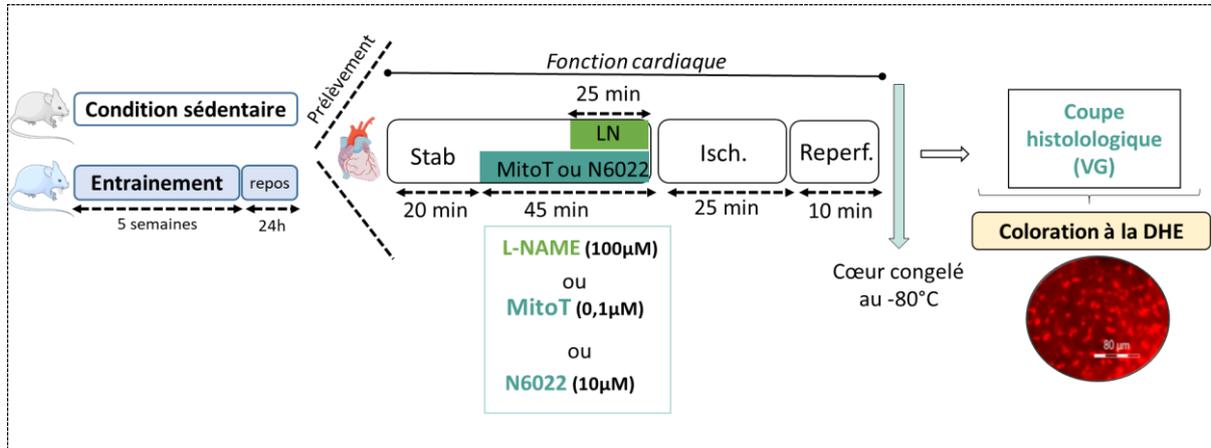


**Figure 27** : Représentation du protocole expérimental de cœur isolé perfusé de l'**ETUDE n°1**.

### 2.1.2. Protocole de l'ETUDE 2

Dans l'**ETUDE n°2**, afin d'évaluer le rôle de la eNOS et de la S-nitrosylation protéique dans la cardioprotection induite par l'exercice physique, sur la production d'ERO au cours de la reperfusion post-ischémique, certains cœurs ont été perfusés 25 minutes avec de la L-NAME (LN, 100  $\mu\text{M}$ , Abcam) ou 45 minutes avec du N6022, un inhibiteur de la GSNOR (N6022, 10  $\mu\text{M}$ , Caymal Chemical), une enzyme responsable de la dénitrosylation protéique (Figure 28).

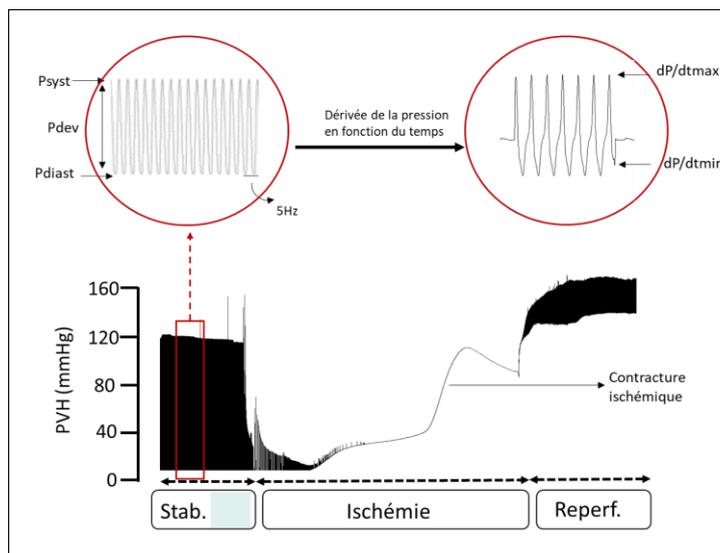
Afin de démontrer que l'effet cardioprotecteur de l'entraînement est en partie lié à une diminution de la production d'EROMt, une perfusion de MitoTempo (0,1  $\mu\text{M}$ ), un piègeur spécifique des EROmt était administré pendant 45 minutes (groupe **Sed + MitoT** et **Ex-Tr + MitoT**).



**Figure 28** : Représentation du protocole expérimental de cœur isolé perfusé de l'ETUDE n°2.

## 2.2. Mesure des paramètres fonctionnels cardiaques

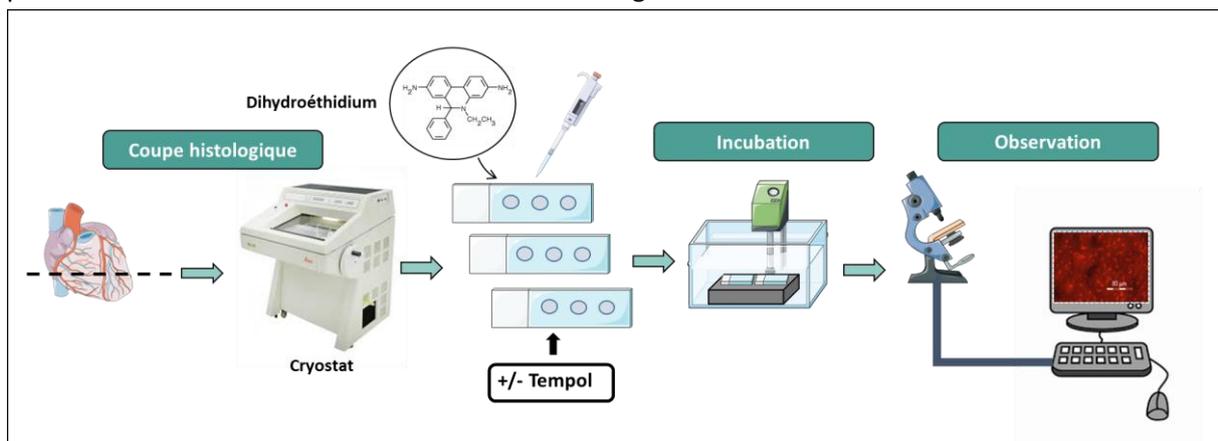
L'enregistrement de la pression intraventriculaire (PIVG) a permis d'évaluer les paramètres fonctionnels cardiaques, tels que la pression systolique ( $P_{syst}$  en mmHg), la pression diastolique ( $P_{diast}$  en mmHg), la pression développée ( $P_{dev}$  en mmHg, définie comme la différence entre la  $P_{syst}$  et  $P_{diast}$ ). Les dérivées maximales ( $dP/dt_{max}$ ,  $mmHg \cdot s^{-1}$ ) et minimales ( $dP/dt_{min}$ ,  $mmHg \cdot s^{-1}$ ) de pression ont été analysées, représentant respectivement les vitesses de contractilité et de relaxation myocardique. Enfin, l'analyse des variables fonctionnelles à la reperfusion a permis d'apprécier le degré de récupération fonctionnelle post-ischémique (Figure 29).



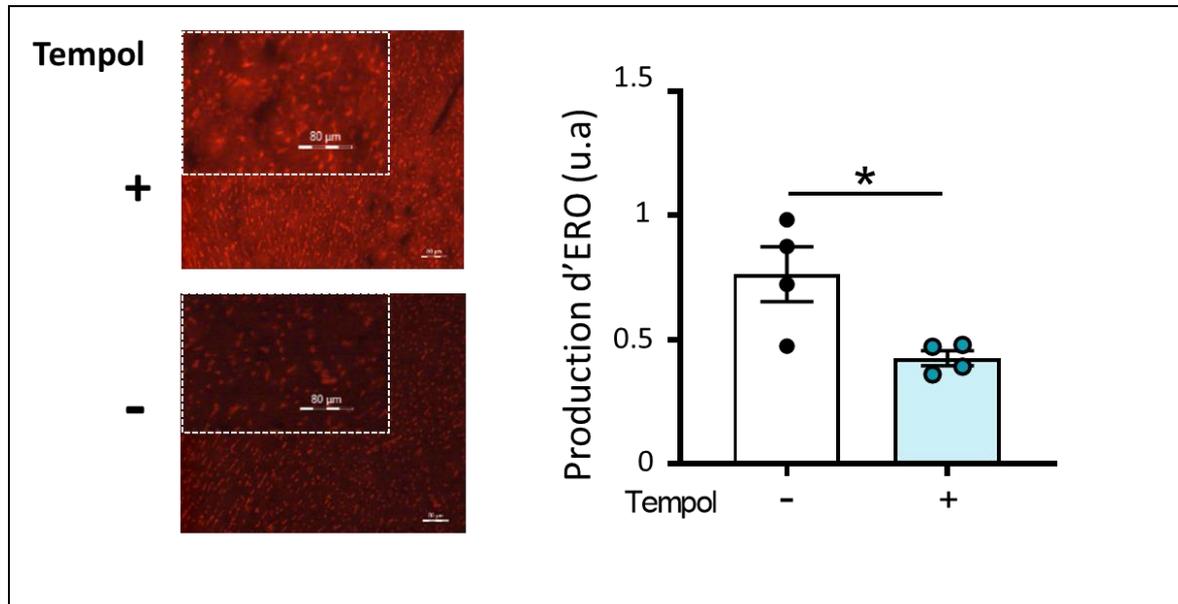
**Figure 29** : Exemple de tracé de pression obtenu au cours d'un protocole d'IR sur cœur perfusé de Langendorff

### 2.3. Evaluation de la production d'ERO tissulaire au cours de la reperfusion (ETUDES n°1 et n°2)

A la fin du protocole d'IR, une partie toujours similaire du VG (ici une zone apicale), a été placée dans un moule en aluminium et recouvert d'OCT, puis congelée à l'azote liquide et conservée à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la réalisation des coupes histologiques. Lors de la coupe, les échantillons étaient placés sur le cryomicrotome et des coupes de  $8\text{ }\mu\text{m}$  étaient réalisées et déposées sur des lames. Les échantillons ont ensuite été immergés dans une solution de Dihydroéthidium (DHE,  $10\text{ }\mu\text{M}$ ) pendant 5 minutes à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en condition humide. Afin de protéger l'échantillon de la lumière et d'éviter une évaporation de la solution, les échantillons étaient préparés dans l'obscurité. Après deux rinçages au PBS (Phosphate Buffered-Saline), les échantillons ont été recouverts d'une lamelle puis conservés à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans l'obscurité jusqu'à l'observation qui avait lieu le jour même. Celle-ci a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence (OLYMPUS BX60, plateforme 3A INRA, Avignon Université, excitation :  $488\text{ nm}$ , émission :  $610\text{ nm}$ ), associé à une caméra (Prog Res CF, Jenoptik). Les images obtenues ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA) (Figure 30). La DHE, sonde fluorescente sensible au  $\text{O}_2^{\bullet}$ , émet une fluorescence bleue dans le cytosol, une fois oxydée, celle-ci s'intercale dans l'ADN cellulaire au niveau du noyau, où elle émet une fluorescence rouge (Figure 30). Afin de s'assurer que la fluorescence observée était bien liée à l'oxydation de la DHE par les ERO, certains échantillons ont été préalablement incubés avec du Tempol ( $20\text{ }\mu\text{M}$ ), un mimétique de la SOD, avant d'être incubé avec la DHE. En présence de Tempol, on observe une diminution marquée du signal fluorescent (Figure 31) permettant ainsi de valider le rôle des ERO dans l'augmentation de fluorescence à la DHE.



**Figure 30** : Protocole d'évaluation de la production d'ERO tissulaires au cours de la reperfusion post-ischémique.



**Figure 31** : Impact du tempol sur la production d'ERO tissulaires évaluées par fluorescence à la DHE. (\* $p < 0,05$ , test t).

### 3. Mesure sur cardiomyocytes isolés

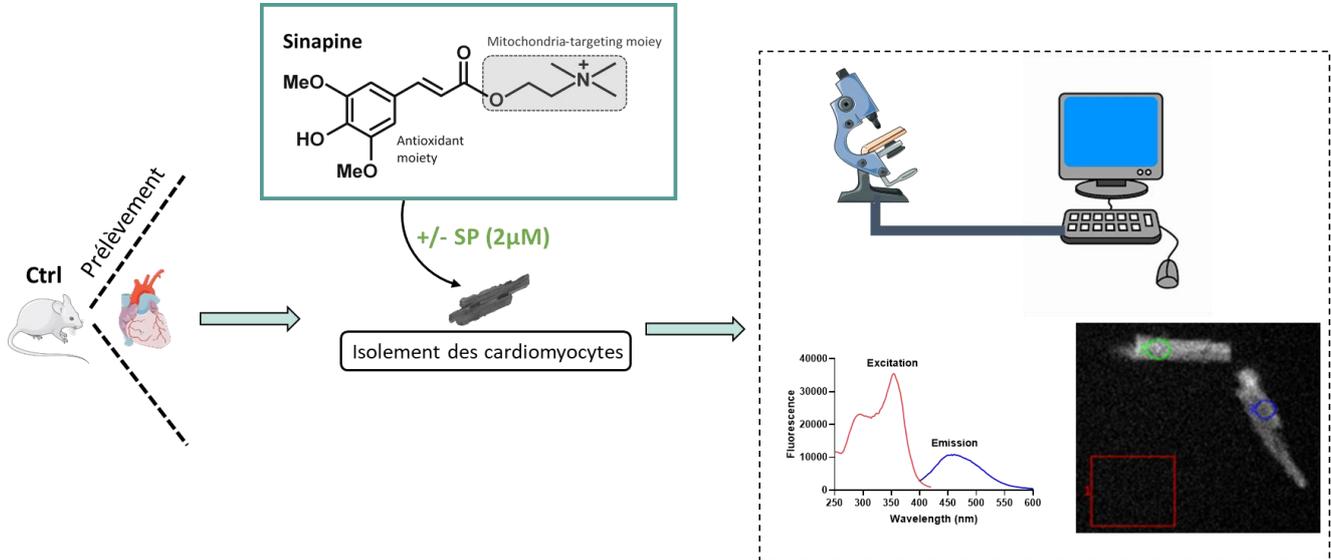
#### 3.1. Isolement des cardiomyocytes

La technique d'isolement des cardiomyocytes utilisée ici a été réalisée en suivant un protocole standard basé sur la digestion enzymatique de la matrice extracellulaire (Wolska and Solaro, 1996). L'utilisation de cardiomyocytes isolés permet de travailler sur des cellules qui ont conservé le phénotype et la fonctionnalité cellulaire de l'organe d'origine. Dans les mêmes conditions que pour la réalisation d'un protocole de cœur isolé perfusé de Langendorff, le cœur était prélevé et canulé de manière rétrograde sur le système de Langendorff (*voir II/2/2.1*). Une fois prélevé, le cœur était plongé dans une solution de Tyrode dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$  (en  $\text{mmol.L}^{-1}$  : NaCl 118, KCl 6,  $\text{NaHCO}_3$  4,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5,  $\text{MgCl}_2$  1,7, Hépès 21, Taurine 20, Glucose 12 ; pH 7,15). Puis, une fois lavé, rincé et canulé de manière rétrograde sur le système de perfusion, le cœur était perfusé pendant 5 minutes avec la solution de Tyrode avant d'être perfusé pendant 20 minutes avec une solution de dissociation contenant de la collagénase de type IV ( $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ , Worthington, SerLabo). A la fin de la digestion enzymatique, le

cœur était sectionné en petits morceaux et placé dans une solution de Tyrode contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA, 15 mM) afin de bloquer l'action de l'enzyme et du butanédione monoxine (BDM, 10 mM), qui est un inhibiteur réversible de la myosine ATPase, empêchant ainsi la contraction des cellules. Les cardiomyocytes étaient ensuite dissociés mécaniquement à l'aide d'une pipette pasteur. Les tissus non dissociés étaient ensuite éliminés par filtration. Tout ceci a permis d'obtenir une solution de cardiomyocytes isolés. Enfin, une remontée calcique graduelle était réalisée par une succession de bains contenant des concentrations croissantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (0 mM, 0,3 mM, 1 mM et 1,8 mM) et des concentrations de BDM décroissantes. Les cardiomyocytes étaient ensuite conservés à 37 °C dans une solution de Tyrode à 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  jusqu'aux expérimentations sur cardiomyocytes isolés. Pendant ce temps, l'état des cellules était visualisé au microscope. Le nombre de cellules vivantes était ensuite évalué par comptage sur lame de Malassez puis rapporté au volume total de solution. Seuls les isolements avec un minimum de 100 000 cellules vivantes par mL étaient utilisés dans la suite des expérimentations.

### 3.2. Biodisponibilité de la sinapine à l'échelle cardiomyocytaire (ETUDE 1)

La mesure de l'entrée de sinapine dans les cardiomyocytes a été réalisée au sein du PHYMEDEXP, sous la responsabilité du DR Olivier Cazorla. Pour cela, le suivi par microscopie à fluorescence de l'autofluorescence de la sinapine au cours du temps (excitation : 340 nm/ émission : 450 nm) a été réalisé sur une préparation de cardiomyocytes isolés, adhérents (laminine) et incubés avec de la sinapine (2  $\mu\text{M}$ ) durant 10 minutes. En se basant sur l'autofluorescence de la sinapine, les cellules ont été excitées à 340 nm en utilisant le système d'excitation lambda DG-4 (Sutter Instrument Compagny). Les images ont ensuite été capturées toutes les 0,5 secondes à l'aide d'une caméra CCD (Photometrics, Roper Scientific) durant 1 heure. Les changements de fluorescence après correction du bruit de fond ont été analysés avec le logiciel Metafluor (Universal Imaging Corporation) (*Figure 32*).



**Figure 32** : Protocole de la mesure de l'entrée de la sinapine dans les cardiomyocytes.

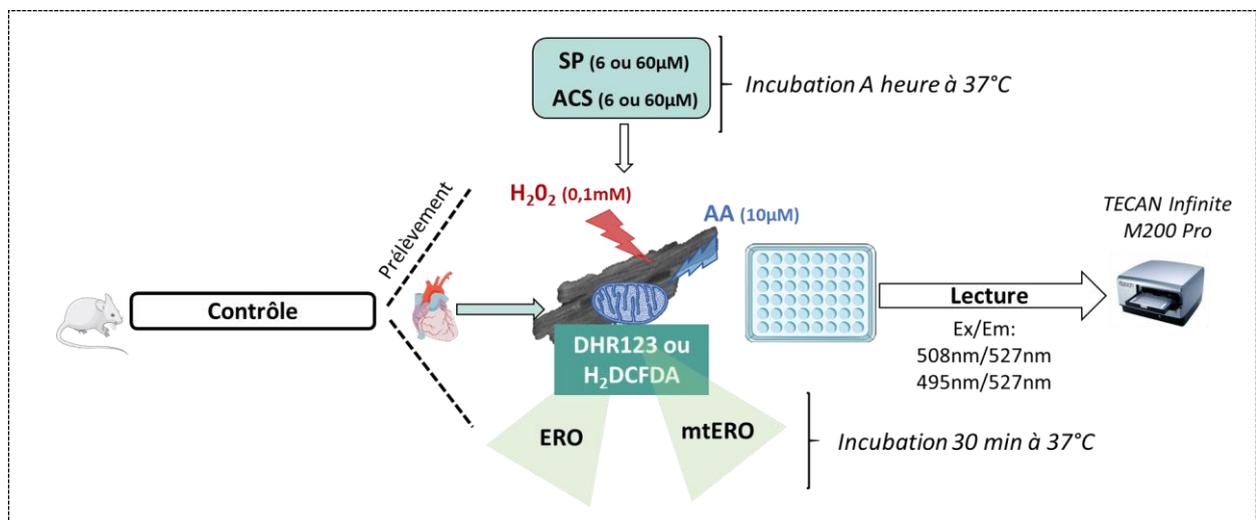
### 3.3. Evaluation de la production d'ERO

L'augmentation de la concentration calcique et de la production d'ERO, représentent deux facteurs clés pouvant conduire à l'activation durable du mPTP et ainsi à la mort cellulaire au cours de l'IR. Il est donc important d'évaluer comment la sinapine ou l'exercice physique sont capable d'impacter cette production de ERO afin de moduler l'activation du mPTP.

#### 3.3.1. Protocole ETUDE 1

Des cardiomyocytes de rats adultes (environ 300 000 cellules/mL) ont été préincubés ou non, 1 heure à 37 °C avec de la sinapine (SP, 6 ou 60 µM) ou de l'acide sinapique (AcS, 60 µM). 30 minutes avant la fin de l'incubation avec la SP et l'AcS, des sondes fluorescentes spécifiques des ERO cytosoliques (H<sub>2</sub>DCFDA, 10 µM, excitation : 495 nm / émission : 527 nm, Invitrogen Molecular probes) et mitochondriales (DHR<sub>123</sub>, 5 µM, excitation : 508 nm / émission : 529 nm, Invitrogen Molecular probes) ont été ajoutées (Kalyanaraman et al., 2012; Mark et al., 1997). Après chaque incubation, un

rinçage des cellules avec une solution de Tyrode (1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) était réalisé afin d'éliminer l'excès de SP et d'ACS mais également de sonde fluorescente (DHR<sub>123</sub> et H<sub>2</sub>DCFDA). Juste avant la lecture, les cellules étaient stimulées avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM, Sigma Aldrich) afin d'induire un stress oxydant global ou avec de l'antimycine A (AA, 10  $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich), un inhibiteur du complexe III de la CTE afin de forcer la production d'ERO par les mitochondries (Quinlan et al., 2011). La fluorescence a été déterminée toutes les 5 minutes durant 30 minutes par spectrofluorimétrie (Tecan Infinite M200 Pro) (Figure 33).

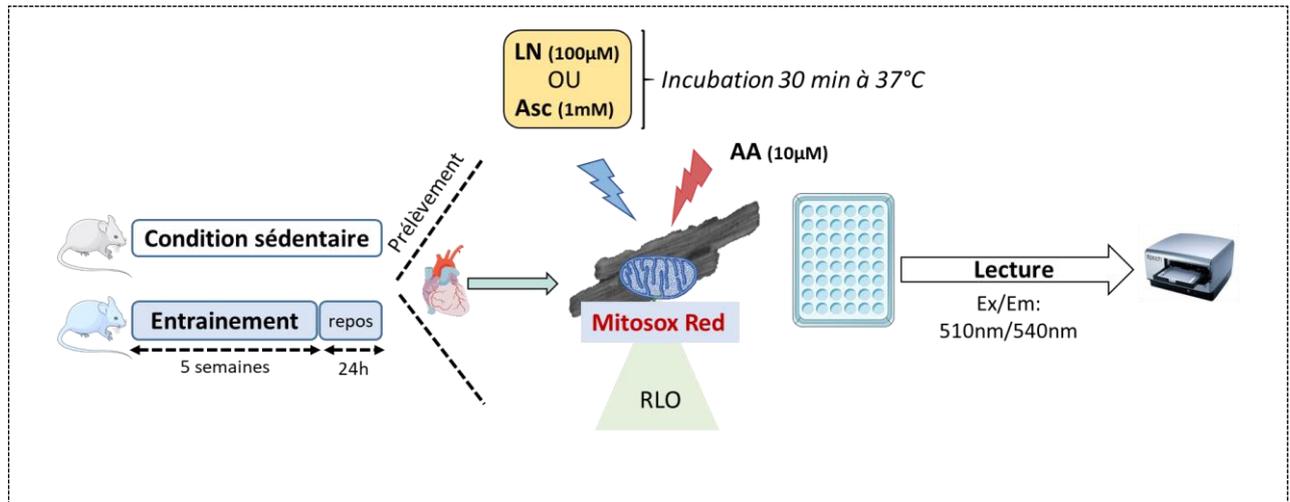


**Figure 33:** Protocole de la production de EROmt réalisé au cours de l'ETUDE n°1

### 3.3.2. Protocole ETUDE 2

Pour cette deuxième étude, l'impact de l'exercice physique sur le stress oxydant mitochondrial a été évalué par spectrofluorimétrie (Biotek™, Synergy™). Pour cela, des cardiomyocytes de rats Sed et Ext-Tr (200 000 cellules/mL) ont été incubés 30 minutes à 37 °C avec une sonde fluorescente sensible au EROmt (spécifique de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), le MitosoxRed (5  $\mu\text{M}$ , excitation : 510 nm / émission : 580 nm, Fisher Scientific Invitrogen). Pour évaluer l'implication de la voie eNOS/NO, certains cardiomyocytes ont été préincubés 30 minutes soit avec de L-NAME un inhibiteur des NOS (LN, 100  $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich) soit avec du L-ascorbate de Sodium, un agent dénitrosylant (Asc, 1 mM, Sigma Aldrich) (Sun et al., 2015b). Après incubation, un rinçage des cellules avec une solution de Tyrode (1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , pour composition voir II/3/3.1) été réalisé afin d'éliminer l'excès de MitosoxRed. Juste avant la lecture, les

cellules étaient stimulées avec un inhibiteur du complexe III de la CTE, l'AA (10  $\mu$ M), afin de forcer la production de ERO par la mitochondrie (Quinlan et al., 2011). La fluorescence a été déterminée toutes les 10 secondes durant 15 minutes (Figure 34).

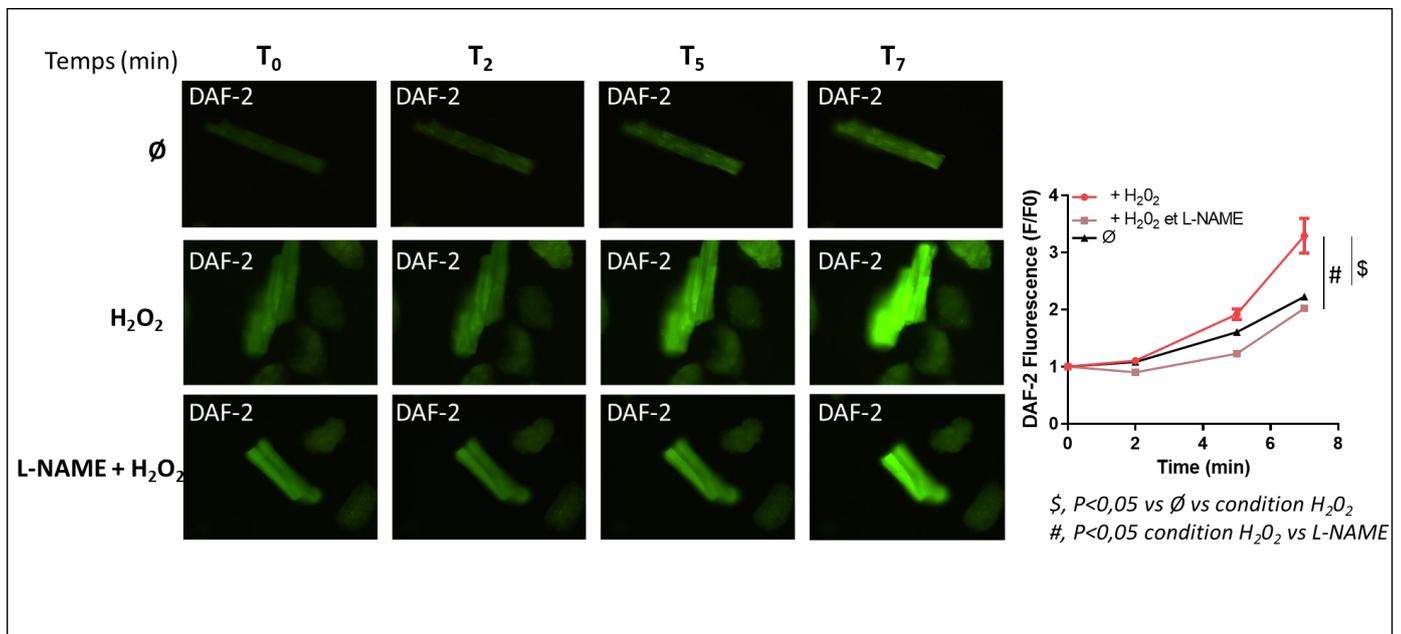


**Figure 34** : Protocole de la production de EROmt réalisé au cours de l'ETUDE n°2.

### 3.4. Mesure de la production de NO (ETUDE 2)

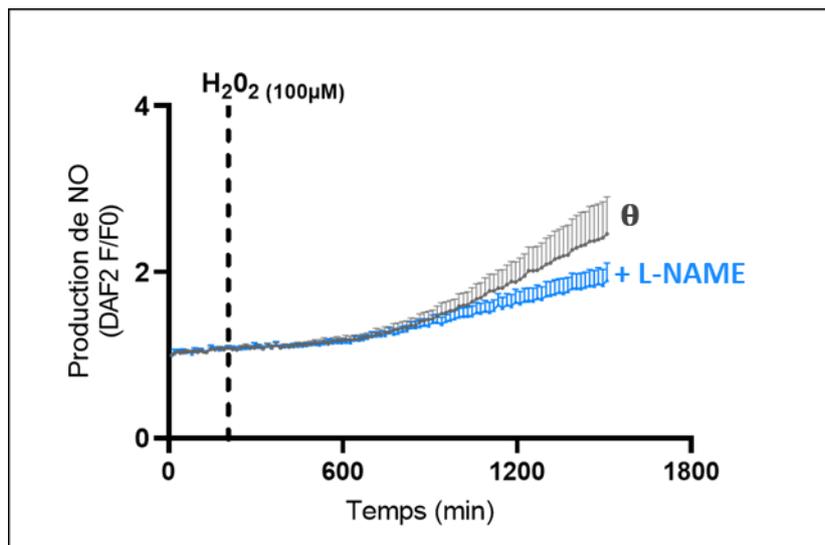
La production de NO par les cardiomyocytes a été mesurée par spectrofluorimétrie et par microscopie confocale. Pour cela, une sonde fluorescente sensible au NO a été utilisée : le 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF2-DA, 5  $\mu$ M; excitation : 491 nm / émission : 513 nm, Cayman chemical). Lors de son entrée dans la cellule, le DAF2-DA est transformé en DAF2 moins perméable aux cellules, empêchant ainsi la perte du signal. En présence d' $O_2$ , le DAF2 réagit avec le NO pour donner la triazolofluorescéine (DAF-2T) hautement fluorescente. Comme décrit précédemment par Sartoretto et al. (2012), la production de NO était stimulée par l'ajout d' $H_2O_2$ , permettant ainsi d'augmenter la production de NO par la phosphorylation de la eNOS (Sartoretto et al., 2011), mais aussi de mimer le stress oxydant cellulaire observé au cours de la reperfusion post-ischémique (Chou et al., 2010).

On a dans un premier temps voulu vérifier par épifluorescence que la fluorescence liée à DAF2 était bien spécifique de la production de NO et que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  permettait bien d'augmenter la production de NO via l'activation de la eNOS (Figure 37). Pour cela, après isolement des cardiomyocytes, certaines cellules cardiaques étaient incubées 30 minutes à 37 °C avec de la L-NAME (100  $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich) dans une solution de Tyrode contenant 1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Au cours des 15 dernières minutes d'incubation avec de la L-NAME les cardiomyocytes étaient chargés avec du DAF2 (5  $\mu\text{M}$ ) durant 15 minutes à 37 °C. Après un rinçage avec une solution de Tyrode (1,8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ), certaines cellules ont été stressées avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) et placées entre lame et lamelle pour observation. Celle-ci a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence (OLYMPUS BX60, excitation : 491 nm / émission : 513 nm), associé à une caméra (Prog Res CF, Jenoptik). Une image était capturée toutes les 2 minutes durant 8 minutes. Les images obtenues ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA) (Figure 35). Cette expérimentation a permis de confirmer que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  représente un stress efficace pour augmenter une production de NO dépendante de la eNOS, puisque l'utilisation de L-NAME diminue la fluorescence de DAF2 en réponse à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 35).



**Figure 35** : Mesure de la production de NO par microscopie à fluorescence, sur des cardiomyocytes stressés ou non avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et traités ou non avec de la L-NAME.

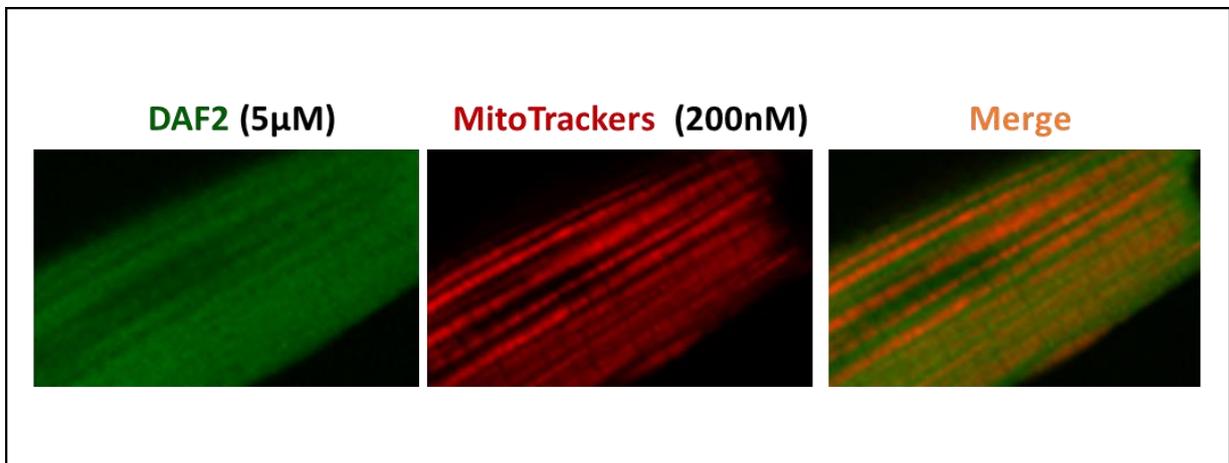
La même procédure a été réalisée mais avec une évaluation de la production de NO par spectrofluorimétrie. Une fois les cellules rincées, celles-ci ont ensuite été réparties dans une microplaque (200  $\mu$ L/puit ; 200 000 cellules/mL) et stressées avec de l' $H_2O_2$  (100  $\mu$ M). La microplaque a ensuite été transférée dans le lecteur microplaque (Biotek™, Synergy™) et la fluorescence a été mesurée toutes les 10 secondes durant 15 minutes (excitation : 491 nm / émission: 513 nm). Les changements en intensité de fluorescence ont été normalisés au niveau de fluorescence avant stimulation  $F_0$ , et les changements de la production de NO sont exprimés sous la forme  $F/F_0$ . Cette méthode a aussi permis de confirmer une augmentation de la fluorescence en présence d' $H_2O_2$  et une diminution de celle-ci en présence de L-NAME (100  $\mu$ M) (Figure 36). Ces expérimentations préliminaires ont permis de confirmer que le stress à l' $H_2O_2$  était bien à l'origine d'une augmentation de la production de NO dépendante de l'activité de la eNOS.



**Figure 36** : Mesure de la production de NO par spectrofluorimétrie sur des cardiomyocytes pré-incubés (courbe bleu) ou non (courbe grise) avec de la L-NAME (100  $\mu$ M).

Afin de réaliser une analyse plus fine de la production de NO dans les mitochondries cardiaques et en se basant sur la même procédure expérimentale, la mesure de la production de NO a ensuite été réalisée par microscopie confocale au sein de la plateforme de microscopie 3A (INRAE-Avignon Université). Pour cela, des cardiomyocytes de rats Sed et Ex-Tr ont été incubés 30 minutes à 37 °C en présence de Mitotracker™ Orange CMTMRos (200 nM, excitation : 554 nm / émission : 576 nm,

Invitrogen, Molecular Probe) permettant un marquage spécifique des mitochondries. 15 minutes avant la fin de l'incubation les cardiomyocytes ont été chargés avec du DAF2 à 37 °C. La production de NO a ensuite été stimulée par l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) (Sartoretto et al., 2011) et les cellules ont été placées entre lame et lamelle pour observation. Les images ont été obtenues par microscopie à fluorescence confocale (SP8, Leica). Le laser 552 nm a permis d'exciter le Mitotracker Orange (excitation : 554 nm / émission : 576 nm, en rouge sur les images), dont la fluorescence, spécifique du compartiment mitochondrial, était recueillie à 576 nm (laser : 0,5%, gain 11%, pinhole : 1). Tandis que le laser 488 nm a permis d'exciter le DAF2 (excitation : 491 nm / émission : 513 nm, en vert sur les images) dont la fluorescence était recueillie à 513 nm (laser : 1%, gain : 65%, pinhole : 1). Toutes les images ont été obtenues avec un objectif 40X. L'intensité de fluorescence a été mesurée avec le logiciel Leica Application Suite X (LAS X). Afin de quantifier et d'évaluer la colocalisation entre le NO (DAF2) et les mitochondries (Mitotracker), le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé. Les images ont été quantifiées à l'aide du logiciel Fiji (NIH) et du plugin Coloc 2. (Figure 37).



**Figure 37** : Image confocale de cardiomyocyte isolé chargé simultanément avec du DAF2 (canal vert, Em : 491 nm ; Ex :513 nm, 5 µM) et du Mitotracker Orange (canal rouge, Ex :554 nm ; Em : 576nm , 200nM). La colocalisation est représentée par une coloration orange.

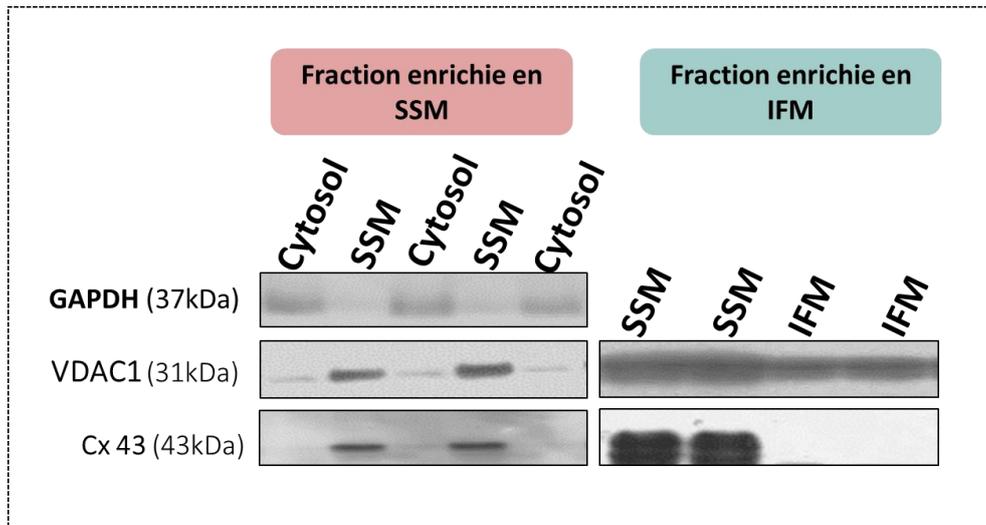
## 4. Evaluation de la sensibilité des mitochondries à un stress calcique (Etude 2)

### 4.1. Préparation des extraits mitochondriaux

Les mitochondries utilisées au cours des **ETUDE 1 et 2** ont été obtenues à partir d'un protocole modifié de centrifugation différentielle, décrit pour la première fois par Lindenmayer et collaborateurs en 1967 (Lindenmayer et al., 1968) (*Figure 16*). L'ensemble de la procédure d'extraction des mitochondries a été réalisée sur glace, à 4 °C.

Après la cardiectomie réalisée dans le *paragraphe II/2/2.1*, le VG des différents groupes expérimentaux était broyé à l'aide d'un Ultra Turrax (Ultra Turrax T25, IKA Labor Technik) dans 2 mL de tampon H (Saccharose 0,3 M, TES 5 mM, EGTA 0,2 mM, BSA 1 mg/mL, pH : 7,2 ajusté avec KOH) à 4 °C. L'homogénat obtenu était ensuite centrifugé à 1 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Pour isoler les SSM, le surnageant 1 était récupéré et de nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot était ensuite resuspendu dans 300 µL de tampon H et correspondait à la fraction enrichie en SSM tandis que le surnageant correspondait à la fraction cytosolique (membrane plasmique, fragment du réticulum endoplasmique). Pour isoler les IFM, le culot 1, qui correspond à la fraction enrichie en IFM + myofilaments, était resuspendu dans 1 mL de tampon H contenant de la nargase (1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, Proteinase Bacterial Type XXIV, Sigma Aldrich) puis incubé pendant 15 minutes à température ambiante avant d'être de nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. La Nargase est une enzyme permettant la digestion des protéines contractiles permettant de libérer les IFM. Le culot 2 ainsi obtenu était resuspendu dans 1 mL de tampon H et centrifugé à 1 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Enfin, le surnageant obtenu était centrifugé une dernière fois à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot 4, correspondant aux IFM, était resuspendu dans 300 µL de tampon H (*Figure 38*). La quantité de mitochondries obtenue était finalement estimée à l'aide d'un dosage de protéines mitochondriales (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific) (*Figure 38*).





**Figure 39** : Contenu protéique des différentes fractions subcellulaires, évalué par Western-blot. VDAC est utilisé comme marqueur spécifique des mitochondries, GAPDH comme marqueur spécifique de la fraction cytosolique et Cx43 comme marqueur spécifique des SSM.

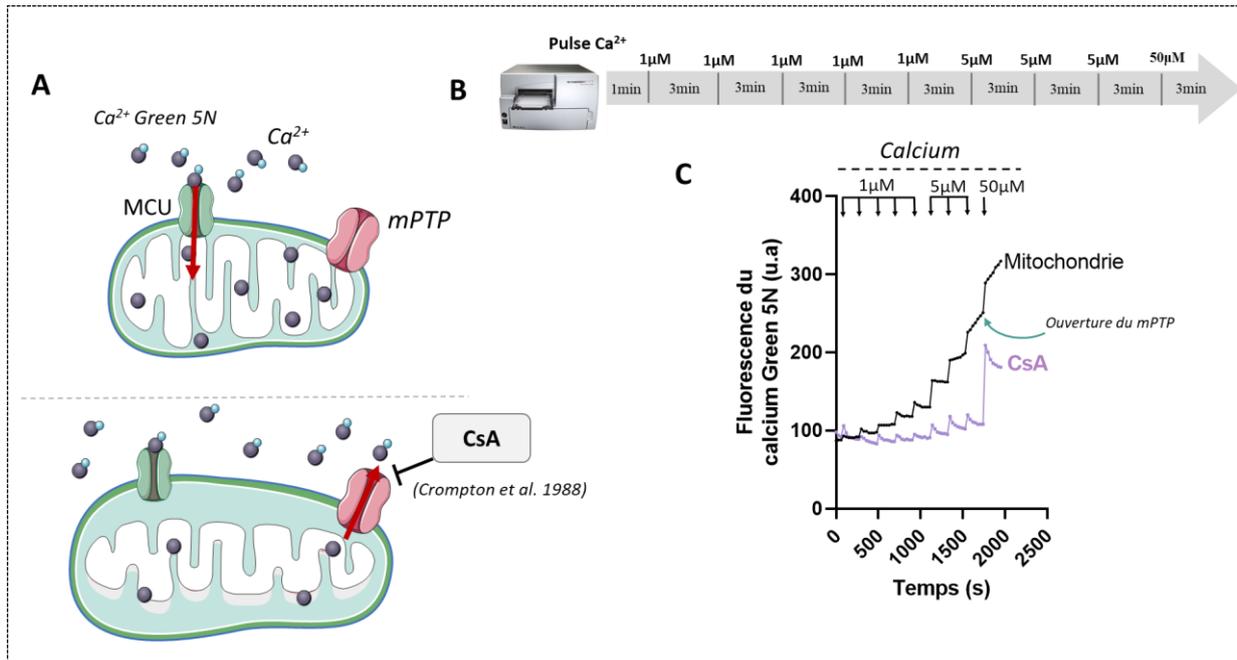
## 4.2. Capacité de rétention calcique (CRC) (ETUDE 2)

Le test de CRC permet de mesurer la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  que la mitochondrie peut accumuler et retenir avant activation irréversible du mPTP. En pratique, ce protocole consiste à ajouter successivement de faibles quantités de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu contenant des mitochondries. Les mitochondries incorporent ce  $\text{Ca}^{2+}$  jusqu'à atteindre une concentration à laquelle le mPTP s'active de manière irréversible entraînant ainsi la libération dans le milieu extérieur du  $\text{Ca}^{2+}$  incorporé. Cette mesure permet d'évaluer la sensibilité de la mitochondrie à un stress calcique tel qu'observé au cours d'une IR.

Afin d'évaluer la CRC mitochondriale, la sonde fluorescente, Calcium Green 5N (1  $\mu\text{M}$ , Invitrogen C3737, excitation : 485 nm / émission : 530 nm) a été utilisée pour mesurer le  $\text{Ca}^{2+}$  extra-mitochondrial. Cette sonde ne diffuse pas à travers les membranes et sa fluorescence est dépendante de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le tampon (Figure 40A). La concentration extra-mitochondriale de  $\text{Ca}^{2+}$  a été suivie indirectement par la mesure de la fluorescence de la sonde Calcium Green 5N par spectrofluorimétrie (Biotek<sup>TM</sup>, Synergy<sup>TM</sup>). Après extraction et dosage des protéines mitochondriales (Dosage BCA), les mitochondries étaient diluées à 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans un tampon énergisant hypo-osmotique (en mM : Saccharose 200, Succinate 5, MOPS 10, EGTA 10  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1, pH : 7,4 ajusté avec

du KOH) et incubées à 25 °C avec du Ca<sup>2+</sup> Green 5N (1 µM) dans une microplaque noire. Après l'ajout de 5 µL de Ca<sup>2+</sup> Green 5N, un ajout successif de Ca<sup>2+</sup> à différentes concentrations et à intervalle de temps précis a été réalisé. En effet, le protocole consistait à réaliser 5 pulses à 1 µM toutes les 3 minutes afin d'activer le MCU (Pan et al., 2013), suivit de 3 pulses à 5 µM et 1 pulse à 50 µM pour être sûr d'activer le mPTP (*Figure 40B et C*).

Afin de s'assurer que le phénomène de « swelling » mitochondrial observé lors de l'ajout successif de concentration croissante de Ca<sup>2+</sup> est bien lié à l'activation du mPTP, la même expérience a été conduite en parallèle en présence de cyclosporine A (CsA, 2 µM, Sigma-Aldrich), largement décrite comme permettant d'inhiber l'activation du mPTP (Crompton et al., 1988). En effet, le mPTP est un complexe protéique dont la composition n'est pas encore totalement connue. Néanmoins, un consensus émerge à ce jour sur le rôle de la Cyp D, comme acteur majeur de l'activation du mPTP. La CsA en se fixant sur la Cyp D, bloque l'interaction de la Cyp D avec le reste du complexe protéique et bloque ainsi l'activation de ce mégapore. En présence de CsA, la mitochondrie est plus résistante, elle accumule une quantité de Ca<sup>2+</sup> plus importante sans que l'on puisse observer de « swelling » mitochondrial, caractérisé ici par une inversion de la pente de la courbe et signifiant que la mitochondrie se met à libérer le Ca<sup>2+</sup> qu'elle avait accumulé dans sa matrice lors des ajouts précédents de Ca<sup>2+</sup> (*Figure 40C*). Afin d'évaluer l'implication de la S-nitrosylation, le même protocole a été réalisé sur des mitochondries pré-incubées ou non avec du sodium L-ascorbate (1 mM), un agent réducteur, connu comme permettant d'induire une dénitrosylation (Sun et al., 2015b; Zhang et al., 2005) ou sur des mitochondries incubées avec du GSNO (1 mM) un donneur de NO.



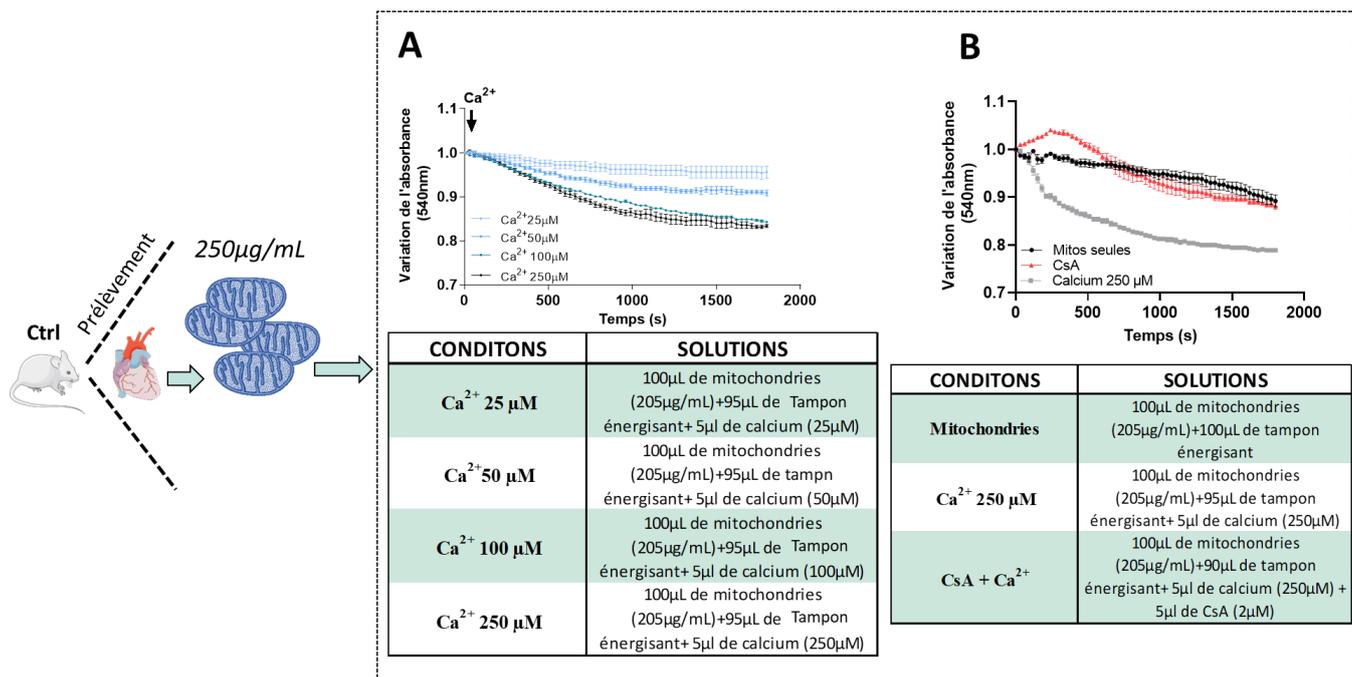
**Figure 40** : Mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries. **(A)**- Principe du test de CRC. **(B)**- Procédure des pulses de calcium sur mitochondries isolées, **(C)**- test de CRC réalisé en présence (tracé violet) ou non (tracé noir) d'un inhibiteur du mPTP, la CsA (2  $\mu$ M).

### 4.3. Test de gonflement des mitochondries (ETUDE 2)

Le test de gonflement des mitochondries ou « swelling » mitochondrial consiste à mesurer l'ouverture du mPTP, suite à l'ajout d'une concentration importante de  $Ca^{2+}$  (250  $\mu$ M). En effet, l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie provoque l'ouverture du mPTP à l'origine d'une entrée massive d'eau et un gonflement des mitochondries. L'IMM peut alors se rompre ce qui entraîne la libération dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques, tel que le cyt c, contribuant à l'activation de l'apoptose au cours de l'IR. La cinétique de ce phénomène a été évaluée par la mesure de la diminution de l'absorbance, du milieu contenant les mitochondries sur lecteur microplaque (Epoch microplate reader, Biotek). Pour cela, après extraction et dosage des protéines mitochondriales, les mitochondries étaient diluées à 250  $\mu$ g/mL dans un tampon énergisant hypo-osmotique (en mM : Saccharose 200, Succinate 5, MOPS 10, EGTA 10  $\mu$ M,  $H_3PO_4$  1, pH : 7,4 ajusté avec du KOH). La variation de l'absorbance à 540 nm toutes les 30 secondes durant 30 minutes a été utilisée afin d'évaluer la cinétique de gonflement des mitochondries en présence de  $Ca^{2+}$  (250  $\mu$ M).

Pour la mise au point du protocole, différentes concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  ont été testées (25, 50, 100 et 250  $\mu\text{M}$ ) (Figure 41A). On observe bien un effet dose sur la cinétique de gonflement des mitochondries. Afin de vérifier que ce phénomène de « swelling » est bien lié à une activation du mPTP, la même procédure a été reconduite en présence de CsA (2  $\mu\text{M}$ , Sigma-Aldrich). Dans nos conditions expérimentales, le stress calcique réalisé en présence de CsA n'est pas à l'origine d'un « swelling » mitochondrial (Figure 41B).

Afin d'évaluer l'implication de la S-nitrosylation dans la cardioprotection induite par l'exercice, ce protocole de gonflement des mitochondries a été réalisé sur des mitochondries de rats Sed et Ex-Tr (ETUDE n°2), pré-incubées ou non avec du sodium L-ascorbate (Asc, 1 mM, Sigma Aldrich).



**Figure 41** : Contrôle du protocole de « swelling » mitochondrial. **(A)** Effet de doses croissantes de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le phénomène de « swelling » mitochondrial. **(B)** « Swelling » mitochondrial en réponse au  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu\text{M}$ ) en présence (courbe rouge) ou non (courbe grise) de cyclosporine A (Csa, 2  $\mu\text{M}$ ).

### III. Analyses biochimiques

Afin d'apporter un rationnel moléculaire aux modifications des paramètres physiologiques observées dans les différentes études, des analyses biochimiques des protéines impliquées dans les voies étudiées ont été réalisées. Les différentes techniques biochimiques présentées ont été faites sur tissu entier de VG, sur cardiomyocytes isolés et mitochondries isolées pour les deux études.

#### 1. Extraction des protéines et dosage de la concentration protéique

##### 1.1. Sur homogénat de cœur total (VG)

Pour toutes les mesures réalisées sur cœur entier, les VG congelés au terme des différentes études étaient homogénéisés à l'aide d'un Ultra Turrax (IKA T10) dans du tampon d'extraction SB (50 mM de Tris-HCl pH : 5,7, 10% de glycérol, 1% de Sodium Dodécyl Sulfate) avec des inhibiteurs de phosphatases NaOV (Fisher Scientific) et de protéases (Sigma Adrich), ou dans du tampon HENS (Thermo Fisher) lors des analyses biochimiques concernant la S-nitrosylation des protéines. Les échantillons étaient ensuite centrifugés à 17 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant était ensuite récupéré et congelé à -80 °C. La concentration totale en protéines de chaque échantillon était évaluée via la méthode de dosage BCA (Bincinchonic acid, Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific).

##### 1.2. Sur mitochondries isolées

Les homogénats des fractions enrichies en mitochondries ainsi que les fractions cytosoliques ont été obtenus comme décrit dans la partie II/4/4.1 du manuscrit. Afin de normaliser la quantité de mitochondries d'une expérimentation à l'autre mais également afin d'étudier l'expression des protéines mitochondriales, par Western Blot, les protéines ont été dosées avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid, Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific).

## 2. Western Blot

Après dosage, les échantillons ont été dénaturés via l'ajout de  $\beta$ -mercapto-éthanol (5%) et incubés 5 minutes à 95 °C. Ensuite, chaque échantillon était déposé et séparé par électrophorèse durant 1 heure dans un gel de dodécyl sulfate de sodium polyacrylamide (SDS-PAGE), avec une solution d'acrylamide (de 7 à 12% selon le poids moléculaire de la protéine étudiée). Les protéines étaient ensuite transférées électriquement pendant environ 1 heure et 30 minutes sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride), préalablement activée dans une solution d'éthanol, à l'aide d'un appareil transblot (Bio-Rad transfert apparatus, Bio-rad Laboratories). Les membranes étaient ensuite incubées dans une solution de blocage, composée de TBS-T (Tris-Buffered Saline, 0,05% de Tween 20, pH : 7,5) et de lait ou de BSA selon la protéine étudiée, afin de saturer les sites non spécifiques. Finalement les membranes étaient incubées avec un anticorps primaire, reconnaissant la protéine d'intérêt, 12 heures sous agitation à 4 °C. Selon la protéine étudiée, les membranes étaient ensuite incubées sous agitation lente en présence de l'anticorps primaire correspondant : VDAC (anti-mouse VDAC, abcam), Cx43 (anti-mouse Cx43, Zymed Laboratories), GAPDH (anti-rabbit GAPDH, Santa Cruz Biotechnology), eNOS (anti-mouse eNOS, BD Biosciences), nNOS (anti-mouse nNOS, BD Transduction Laboratories), P-eNOS (anti-mouse P-eNOS Ser1177, BD Biosciences). Suite à l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes étaient rincées par 3 lavages de 5 minutes avec du TBS-T, puis incubées avec un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps utilisé, pendant 1 heure à température ambiante. A nouveau, les membranes étaient rincées 4 fois au TBS-T, puis immergées dans une solution d'ECL (Enhanced ChemiLuminescence, ThermoScientific), contenant du luminol, substrat de l'enzyme HorseRadish Peroxydase (HRP) conjuguée à l'anticorps secondaire. Cette peroxydase catalyse la transformation du substrat et permet ainsi l'émission d'un signal lumineux ce qui permet la révélation de la protéine d'intérêt sur un film photographique. Les résultats étaient ensuite analysés grâce au logiciel Image J (National Institute of Health, USA).

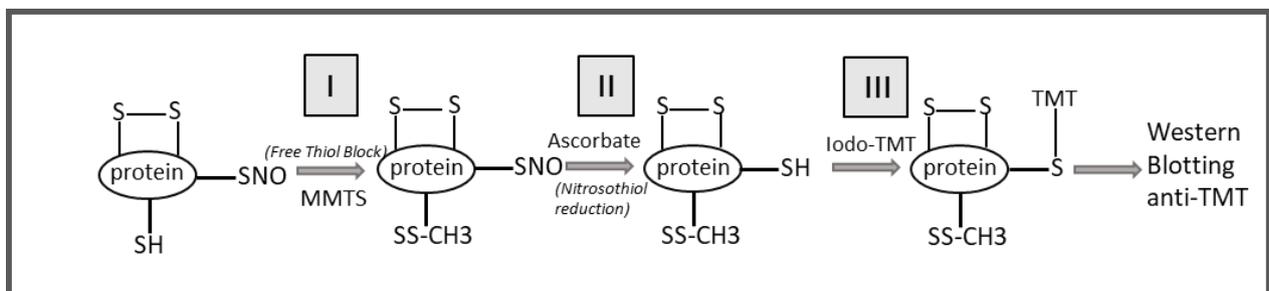
## 3. Mesure du s-nitrosoproteome des mitochondries cardiaques

Dans l'**ETUDE n°2**, la S-nitrosylation des protéines mitochondriales cardiaques a été évaluée de deux manières différentes : **1)** Par Western Bot en utilisant la méthode du « TMT switch assay » (Pierce S-nitrosylation Western Blot kit, Thermo Fisher Scientific) et **2)** par chromatographie en phase liquide

couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) réalisée en collaboration avec le Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (SPI/LI2D, Palteforme ProGénoMix, CEA Marcoule). Ces analyses de s-nitrosoprotéomique ont été réalisées sous la direction de Jean Armengaud (CEA) et Béatrice Alpha-Bazin (CEA).

### 3.1. Mesure de la s-nitrosylation par Western Blot

La S-nitrosylation des protéines cardiaques a été évaluée en utilisant la méthode du « TMT switch assay » (Pierce™ S-nitrosylation WesternBlot kit, ThermoFisher Scientific). La méthode du « TMT switch assay » consiste à modifier les cystéines nitrosylées afin de les rendre détectable dans notre homogénat. Pour cela, les groupements thiols non modifiés des cystéines étaient bloqués via l'ajout de methanéthiosulfonate de méthyle (MMTS) (Figure 42-I) puis l'ajout de sodium L-Ascorbate (1 mM) a permis de réduire les cystéines déjà nitrosylées (Figure 42-II). Finalement, l'iodoTMT se fixait ensuite de manière irréversible sur ces résidus dénitrosylés (Figure 42-III). On parle d'étiquetage des cystéines nitrosylées. Les protéines étaient ensuite séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane PVDF. Après un blocage de 1 heure avec du lait 5 %, les membranes étaient ensuite incubées en présence d'un anticorps primaire anti-TMT (mouse, 1/5000, Thermo Fisher Scientific) toute la nuit, sous agitation, à 4 °C. L'anticorps secondaire (anti-mouse, 1/20 000, BD Biosciences) était incubé 1 heure à température ambiante. Finalement, les protéines étaient visualisées grâce à la chemiluminescence par une immersion dans une solution d'ECL, suivit d'une révélation sur film photographique. L'intensité des bandes est représentative du niveau de S-nitrosylation protéique et est également mesurée grâce au logiciel Image J®.



**Figure 42 :** Protocole expérimental de la méthode « TMT switch assay » permettant la détection des résidus protéiques S-nitrosylés.

### 3.2. Mesure du S-nitroproteome par LC-MS/MS

Toute la préparation des échantillons, c'est-à-dire isolement des différentes fractions subcellulaires (fraction enrichie en SSM et homogénat total) et étiquetage des cystéines nitrosylées a été réalisée au LaPEC, tandis que l'analyse du s-nitrosoproteome a été réalisé au Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (SPI/LI2D, Palteforme ProGénoMix, CEA Marcoule).

#### 3.2.1. Préparation des échantillons et étiquetage des cystéines nitrosylées.

Les SSM cardiaques intactes (1 mg/mL) ont été obtenues de manière identique à celles exposées dans la partie III/3.1. Après extraction des protéines mitochondriales (fraction enrichie en SSM), le culot était remis en suspension dans du tampon HENS contenant (en nmol. L<sup>-1</sup>) : HEPES-NaOH (250), EDTA (1) et Neocuproine (0,1) avec 2,5% de SDS et un inhibiteur de protéase sans EDTA. Afin de libérer les protéines mitochondriales, les SSM ont été soumises à 3 cycles de congélation/décongélation dans de l'azote liquide. Les fragments lipidiques non dissous ont été éliminés par centrifugation (10 000 g durant 10 minutes, 4 °C). L'étiquetage des cystéines nitrosylées a été réalisé à l'aide du kit de marquage et d'enrichissement du Tandem Mass Tag réactif à la cystéine (cysTMT, ThermoFisher Scientific). La S-nitrosylation étant une modification post-traductionnelle très sensible à la lumière, toutes les procédures précédemment décrites ont été réalisées dans l'obscurité. (Figure 42 pour représentation du protocole d'étiquetage).

Les homogénats de VG (1000 µg) de cœur de rats Sed et Ex-Tr ont été extraits et resuspendus dans du tampon HENS contenant (en nmol.L<sup>-1</sup>) = de l'HEPES-NaOH (250), de l'EDTA (1) et du Neocuproine (0,1) avec 2,5% de SDS et un inhibiteur de protéases sans EDTA. Afin de bloquer les cystéines non modifiées (c'est-à-dire libres), les échantillons sont incubés avec du MMTS (20 mM) pendant 30 minutes à température ambiante. Afin d'éliminer le MMTS, les protéines étaient précipitées en utilisant de l'acétone pré-refroidie à -20 °C pendant 1 heure. Après élimination du MMTS, les échantillons étaient remis en suspension dans du tampon HENS et incubés avec de l'ascorbate (1 mM) et de l'iodo-TMT, pendant 1 heure à 37 °C, à l'obscurité. La réaction est stoppée via l'ajout de DTT (20 mM, 15 minutes à 37 °C, dans l'obscurité). L'excès de iodo-TMT était éliminé par précipitation à l'acétone et les protéines étaient lavées avec de l'acétonitrile, suivi de deux lavages supplémentaires à l'acétone. Les échantillons étaient ensuite préparés à une concentration de 1

mg.mL<sup>-1</sup> et soumis à une digestion à la trypsine à 50 °C durant 1 heure. L'ajout d'acide trifluoroacétique permettait une acidification du milieu (concentration finale 0,4%). Après l'ajout de trypsine (rapport enzyme/substrat : 1:40), la lyse des protéines était effectuée à 50°C durant 1 heure. Les peptides résultants ont été dessalés à l'aide de cartouches d'extraction en phase solide C18 (ThermoScientific) et lyophilisés à l'aide d'un concentrateur sous vide (SpeedVac, Thermo Fisher). Les peptides étaient ensuite dilués dans une solution saline (TBS) et incubés avec une résine anti-TMT durant 2 heures, à température ambiante. Le surnageant était ensuite éliminé et la résine était rincée 5 fois avec du TBS et 3 fois avec de l'eau ultra pure. Les peptides marqués au CysTMT étaient ensuite élués à l'aide de 4 colonnes de tampon d'éluion TMT (Thermo Scientific). Toutes les fractions étaient ensuite combinées et lyophilisées dans un concentrateur sous vide et remise en suspension 0,1% d'acide formique.

### **3.2.2. Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem sur Q Exactive HF (LC-MS/MS)**

La spectrométrie de masse en tandem par chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS) a été réalisée au sein de la Palteforme ProGénoMix, CEA Marcoule par Jean-charles Gaillard. La LC-MS/MS a été réalisée l'aide d'un système nano-LC Ultimate 3000 couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific), fonctionnant comme décrit précédemment par Klein et al., en 2016 (Klein et al., 2016). Pour cela, les peptides étaient d'abord chargés sur une pré-colonne PepMAP 100 C18 en phase inversée (5 µm, 100 Å, 300 µm, Thermo Fisher), puis séparés sur une colonne nanoLC PepMap 100 C18 à phase inversée nanométrique (3 µm, 100 Å, ThermoFisher), en utilisant un gradient de 2 heures de la phase mobile A (0,1% HCOOH/100% H<sub>2</sub>O) et de la phase B (0,1% HCOOH/ 80% CH<sub>3</sub>CN/ 20% H<sub>2</sub>O) à un débit de 200 mL.min<sup>-1</sup>. Le spectromètre (Q réactive HF) a été utilisé dans un mode Top20, dépendant des données (balayage MS1 haute résolution (60 000) pour les ions précurseurs, suivit de balayages MS2 basé sur les 20 ions précurseurs des plus abondants en 10 secondes), avec une plage de balayage d'acquisition MS de 350 à 1800 *m/z*. Les ions secondaires ont été isolés à une limite de 2,0 *m/z*.

### **3.2.3. Exploration des données MS**

Les fichiers bruts générés à partir du Q-Exactive HF ont été analysés à l'aide du logiciel Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific). La liste des pics a été générée à l'aide du logiciel Mascot

Daemon (version 2.6.1 Matrix Science), en utilisant le filtre d'importation des données « extract\_msn.exe » (Thermo Fisher Scientific) du package Xcalibur FT (version 2.0.7 ; Thermo Fisher Scientific). Les options de filtre d'importation des données appliquées sont 400 pour la masse minimale, 5000 pour la masse maximale, 0 pour la tolérance de regroupement, 0 pour les analyses intermédiaires et 1000 pour le seuil (en accord avec les recommandations de (Christie-Oleza et al., 2012)). Les spectres MS/MS ont été attribués en utilisant les critères de recherche suivants : base de données : Rattus\_norvegicus\_sprague-dawlet\_NCBInr\_2019-01-11. Tous les peptides identifiés avec un p inférieur à 0,05 et toutes les protéines identifiées avec au moins deux séquences peptidiques distinctes ont été analysés à l'aide du logiciel IRMa 1.31.1c (Dupierris et al., 2009). Le nombre de spectres MS/MS attribués par protéine a été compté pour toutes les protéines sélectionnées. La comparaison de l'abondance des protéines entre les différents groupes expérimentaux a été réalisée en utilisant le test T-fold (Carvalho et al., 2012) permettant une classification statistique : bleu pour un fold change  $\geq 1,5$  et une valeur de  $p \leq 0,05$ , orange pour une p value  $\leq 0,05$  et un fold change  $\geq 1,5$ , vert pour un fold change  $\geq 1,5$ , et une p value  $\geq 0,05$  et rouge pour un fold change  $\leq 0,05$  et une p value  $\geq 0,05$ . Enfin, une analyse statistique spécifique de type PLS-DA et sPLS-DA a été réalisée en utilisant le package mixOmics pour R.

#### IV. Traitement statistique

Pour l'ensemble des deux études présentées dans ce travail les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM) et les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism (8.4.3). Avant analyse statistique, nous avons vérifié la normalité des distributions grâce aux coefficients de Kurtosis et Skewness. Pour la comparaison de deux groupes expérimentaux un test *t* non apparié de Student a été utilisé. Pour la comparaison de 3 groupes ou plus, une analyse de variance (ANOVA), en mesures répétées si nécessaire, suivi d'un test *t* de Bonferonni ont été utilisés. Lorsque le risque  $\alpha$  est inférieur à 5% les variables mesurées sont considérées comme statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ). Pour l'**ETUDE n°1**, les statistiques des *Figures 4 et 5* ont été obtenues avec une programmation R (disponible sur <https://www.R-project.org/>.) et en utilisant un modèle mixte linéaire via nlme (**Nlme citation info, (n.d.)** <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/citation.html>, Accessed 15th Nov 2019).

# RESULTATS



# NATUREX



## ETUDE n°1

# LA SINAPINE, MAIS PAS L'ACIDE SINAPIQUE, NEUTRALISE LE STRESS OXYDANT MITOCHONDRIAL DANS LES CARDIOMYOCYTES



ELSEVIER

Redox Biology

Volume 34, July 2020, 101554



## Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes

Doria Boulghobra <sup>a</sup>, Pierre-Edouard Grillet <sup>b</sup>, Mickaël Laguerre <sup>c</sup>, Mathieu Tenon <sup>c</sup>, Jérémy Fauconnier <sup>b</sup>,  
Pascale Fança-Berthon <sup>c</sup>, Cyril Reboul <sup>a</sup> <sup>1</sup> , Olivier Cazorla <sup>b</sup> <sup>1</sup>

*Ce travail est le résultat d'une collaboration entre mon laboratoire d'accueil, l'équipe du DR Olivier Cazorla (PHYMEDEXP, Montpellier), et la société Naturex (Avignon). Il a été publié dans le journal Redox Biology en 2020 et a donné lieu à un dépôt de brevet (Patent n°1916219.7).*

## I. Etude n°1

### 1. Contexte scientifique

Au cours de l'infarctus du myocarde, les mitochondries vont générer un important stress oxydant lors des premières minutes de la reperfusion post-infarctus. Celui-ci est bien connu comme jouant un rôle clé dans la sévérité des lésions de reperfusion et donc dans le pronostic vital du patient. Il semble ainsi essentiel de pouvoir cibler spécifiquement ce stress oxydant afin de prévenir la mise en place d'un cercle vicieux entre ERO et  $\text{Ca}^{2+}$  et ainsi protéger l'intégrité mitochondriale et cellulaire au cours de l'IR. Une stratégie utilisée à ce jour et qui s'est montrée efficace pour limiter le stress oxydant mitochondrial est d'utiliser la différence de  $\Delta\Psi_m$  afin d'adresser à la matrice mitochondriale, très électronégative, des antioxydants cationiques. Nous avons ici, identifié un antioxydant naturel, la sinapine, que l'on retrouve dans les plantes de la famille des Brassicaceae et dont les propriétés chimiques (antioxydant cationique, ester de choline de l'acide sinapique) pourraient lui conférer un tropisme mitochondrial.

### 2. Objectifs

**Dans ce contexte, l'objectif de cette première étude de thèse était de tester si la sinapine, un antioxydant naturel cationique peut cibler les mitochondries afin d'y moduler le stress oxydant. Pour cela i) on a vérifié que la sinapine était capable d'entrer dans les cardiomyocytes et ainsi limiter le stress oxydant mitochondrial et ii) évaluer l'impact des effets antioxydants de cette molécule au cours d'un syndrome d'IR myocardique.**

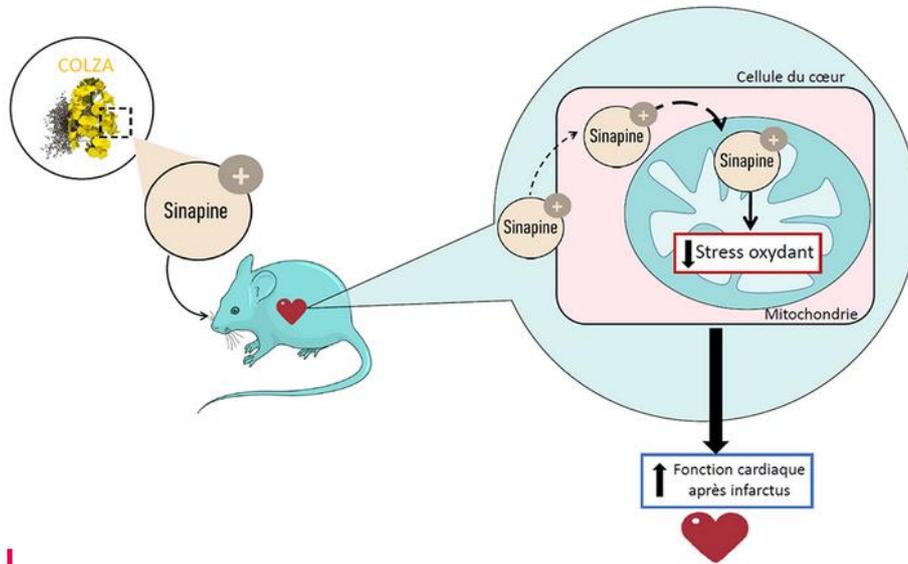
### 3. Résumé

#### 3.1. Méthodologie et résultats majeurs :

Pour cela, des expériences ont été réalisées *in vitro*, *in cellulo*, *ex vivo* et *in vivo* sur tissu cardiaque. L'acide sinapique (produit d'hydrolyse de la sinapine), dépourvu du groupement choline chargé positivement présent dans la sinapine, a été utilisé comme contrôle négatif. L'entrée de la sinapine dans les mitochondries a été évaluée *in vivo* et sur cardiomyocytes isolés, en utilisant les propriétés d'autofluorescence de la molécule. On observe que la sinapine est capable de passer du tractus digestif au compartiment sanguin, mais que celle-ci est également capable de passer les membranes des cellules cardiaques pour finalement entrer dans les mitochondries. L'effet antioxydant de la sinapine a été évalué sur des cardiomyocytes de rats incubés ou non avec de la sinapine ou de l'acide sinapique. La mesure de la production d'ERO a été évaluée à l'aide de sondes fluorescentes sensibles au stress oxydant cytosolique (H<sub>2</sub>DCFDA) et mitochondrial (DHR<sub>123</sub>). De manière intéressante, seule la sinapine permet de limiter la production d'ERO suite à un stress mitochondrial induit par l'antimycine A, un bloqueur du complexe III de la CTE. Afin de confirmer ce résultat à une échelle plus intégrée, des cœurs ont été perfusés ou non avec de la sinapine, de l'acide sinapique ou du MitoTempo (un mimétique de la SOD ciblant les mitochondries) puis ont été soumis à une IR. Les cœurs traités avec de la sinapine présentent une meilleure récupération fonctionnelle suite à une IR (amélioration de la Pdev, de la dpmax/dt ; et de la dpmin/dt) associée à une moindre production d'ERO par les cardiomyocytes (fluorescence de la sonde DHE).

#### 3.2. Conclusion

Cette étude a donc permis, pour la première fois, d'identifier un antioxydant naturel possédant des propriétés physico-chimiques lui permettant de cibler le stress oxydant mitochondrial. De nombreuses pathologies, dont l'infarctus du myocarde (étudié ici), mais aussi des maladies métaboliques (tel que le diabète), l'hypertension, les maladies neurodégénératives ou même le vieillissement impliquent des défauts de fonctionnement de la mitochondrie et un stress oxydant mitochondrial. Cette étude pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies de protection des mitochondries basées sur l'utilisation d'antioxydants naturels (*Figure 43*).



**Figure 43** : Action mitochondriale de la sinapine : des effets bénéfiques pour la fonction cardiaque après ischémie-reperfusion.

## 4. Article

Redox Biology 34 (2020) 101554



Contents lists available at ScienceDirect

Redox Biology

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



### Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes



Doria Boulghobra<sup>a</sup>, Pierre-Edouard Grillet<sup>b</sup>, Mickaël Laguerre<sup>c</sup>, Mathieu Tenon<sup>c</sup>,  
Jérémy Fauconnier<sup>b</sup>, Pascale Fañça-Berthon<sup>c</sup>, Cyril Reboul<sup>a,\*,1</sup>, Olivier Cazorla<sup>b,\*,\*,1</sup>

<sup>a</sup> EA 4278, Laboratoire de Pharm-Écologie Cardiovasculaire, Avignon University, Avignon, France

<sup>b</sup> PHYMEDEXP, INSERM, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>c</sup> Naturess SA, Science and Technology Department, Avignon, France

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Mitochondria  
Natural antioxidant  
Oxidative stress  
Ischemia-reperfusion

#### ABSTRACT

**Introduction:** When confronted to stress or pathological conditions, the mitochondria overproduce reactive species that participate in the cellular dysfunction. These organelles are however difficult to target with antioxidants. A feature of mitochondria that can be used for this is the negatively charged compartments they form. Most of mitochondrion-targeting antioxidants are therefore cationic synthetic molecules. Our hypothesis is that such mitochondriotropic traits might also exist in natural molecules.

**Aim:** We tested here whether sinapine, a natural phenolic antioxidant-bearing a permanent positive charge, can target mitochondria to modulate mitochondrial oxidative stress.

**Methods:** Experiments were performed *in-vitro*, *in-cellulo*, *ex-vivo*, and *in-vivo*, using cardiac tissue. The sinapic acid -lacking the positively-charged-choline-moiety present in sinapine-was used as a control. Sinapine entry into mitochondria was investigated *in-vitro* and in cardiomyocytes. We used fluorescent probes to detect cytosolic (H<sub>2</sub>DCFDA) and mitochondrial (DHR<sub>123</sub>) oxidative stress on cardiomyocytes induced with either hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or antimycin A, respectively. Finally, ROS production was measured with DHE 10 min after ischemia-reperfusion (IR) on isolated heart, treated or not with sinapine, sinapic acid or with a known synthetic mitochondrion-targeted antioxidant (mitoTempo).

**Results:** We detected the presence of sinapine within mitochondria *in-vitro*, after incubation of isolated cardiomyocytes, and *in-vivo*, after oral treatment. The presence of sinapic acid was not detected in the mitochondria. Both the sinapine and the sinapic acid limited cytosolic oxidative stress in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Only sinapine was able to blunt oxidative stress resulting from antimycin A-induced mtROS. Both mitoTempo and sinapine improved cardiac functional recovery following IR. This was associated with lower ROS production within the cardiac tissue.

**Conclusion:** Sinapine, a natural cationic hydrophilic phenol, commonly and substantially found in rapeseed species, effectively (i) enters within the mitochondria, (ii) selectively decreases the level of mitochondrial oxidative stress and, (iii) efficiently limits ROS production during cardiac ischemia-reperfusion.

#### 1. Introduction

Mitochondria are important intracellular organelles that are present in eukaryotic cells. Considering their key role in energy production and regulation of cell-stress-pathways, the mitochondria are critical targets when trying to understand tissue injury and disease. In the heart, the

energy required to sustain the continuous contractile activity is almost exclusively provided by the mitochondria. In pathological conditions, the impaired mitochondrial electron transport chain (ETC) activity increases reactive oxygen species (ROS) production, leading to mitochondrial-driven injuries. Mitochondrial oxidative stress contributes to cell damages such as lipid peroxidation, proteins oxidation and DNA

\* Corresponding author. Laboratoire de Pharm-écologie Cardiovasculaire – EA4278; Faculty of Sciences, Avignon Université 74 rue Louis Pasteur, 84000, Avignon, France.

\*\* Corresponding author. "Physiologie et Médecine Expérimentale du cœur et des muscles – PHYMEDEXP" Inserm - CNRS – Université de Montpellier ; CHU Arnaud de Villeneuve, 34295, Montpellier cedex 05, France.

E-mail addresses: [cyril.reboul@univ-avignon.fr](mailto:cyril.reboul@univ-avignon.fr) (C. Reboul), [olivier.cazorla@inserm.fr](mailto:olivier.cazorla@inserm.fr) (O. Cazorla).

<sup>1</sup> both senior co-authors and co-corresponding authors

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101554>

Received 3 February 2020; Received in revised form 9 April 2020; Accepted 22 April 2020

Available online 19 May 2020

2213-2317/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

damages. The overproduction of mitochondrial ROS (mtROS) in the cardiovascular system results in proinflammatory cytokine production [1], hypertension [2], arrhythmia, contractile dysfunction, as well as hypertrophy, heart failure or ischemia-reperfusion injuries [3].

Accordingly, mitochondria constitute an important target for antioxidants to reduce mitochondrial oxidative stress, when endogenous defenses are overwhelmed. One limitation of this antioxidative strategy is to specifically target the mitochondria. Their specific property of forming negatively charged compartments can be used though. Actually, the electron transport chain activity creates a proton gradient across the inner mitochondrial membrane ( $\Delta H^+$ ) that is used to drive the production of ATP by ATP synthase. The  $\Delta H^+$  generates a mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) around -180 mV. Fifty years ago, the dibenzyl ammonium cation was shown to accumulate into the mitochondrial matrix according to this negative potential [4]. The mitochondrial tropism of some synthetic cations was then derived towards the specific development of antioxidants. Indeed, the cationic moiety—such as the triphenyl phosphonium cation (TPP<sup>+</sup>)—is covalently grafted to a neutral antioxidant, thus imparting the latter with mitochondrion-targeting properties. The high negative  $\Delta\psi_m$  creates an electromotive force and thus offers a very selective way to deliver antioxidants to these organelles. Examples of such antioxidants targeting mitochondria include the TPP-ubiquinone, MitoQ [5], TPP-tocopherol [6], and MitoTEMPO [7]. These TPP-conjugates have been reported to significantly decrease the level of various mtROS. Considering the relative impermeability of biological membranes to hydrophilic molecules, hydrophobicity of compounds is also proposed as a key element to target mitochondria [8]. However, some hydrophilic chemical moieties, such as the choline ester -bearing a cationic charge covalently grafted to sulfhydryl compounds such as glutathione or N-acetyl-L-cysteine have been also proposed as mitochondrial targeting compounds [9]. These chemical modifications increase the ability of the resulting antioxidants to accumulate within the mitochondria and limit the oxidative damages [9,10].

Although many natural antioxidants have already been discovered, to our knowledge and so far, most mitochondrial selective antioxidants are synthetic compounds. There is however no reason to think that the chemical traits responsible for the mitochondrial targeting properties of synthetic compounds are not also present in some natural antioxidants. Herein, we report the identification of sinapine as a natural antioxidant with a mitochondrial tropism. This compound is present in substantial amounts in the *Brassicaceae* family, most especially in rapeseed and mustard. As a choline ester of the sinapic acid, the sinapine contains a quaternary amine that is permanently and positively charged that might confer to the sinapine a significant mitochondrial tropism. We therefore tested here the hypothesis that such a natural antioxidant, bearing a permanent positive charge, can enter within mitochondria to modulate mitochondrial oxidative stress when confronted to some stress situation. *In-vivo*, on isolated heart and on primary isolated rat cardiomyocytes, we found that the sinapine (i) enters within the mitochondria, (ii) decreases the levels mitochondrial oxidative stress, and (iii) prevents the overproduction of ROS when under stress.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal studies

Male Wistar rats (12-week-old, n = 78; weight =  $361 \pm 4$  g; Janvier, France) were housed with a 12-h light-dark cycle and free access to water and food. All investigations conformed to the European Parliament Directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Languedoc-Roussillon, n° CEEA-00322.03).

**Isolated cardiomyocytes** Ventricular cardiomyocytes were isolated as previously described [11]. Rats were euthanized using an i.p. injection of pentobarbital sodium (100 mg/kg) with heparin (100 U).

The heart was rapidly excised, rinsed in an ice-cold Hanks-HEPES buffer (in mM NaCl 117, KCl 5.7, NaHCO<sub>3</sub> 4.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.7, HEPES 21, glucose 11.7, taurine 20, pH at 7.15), mounted on a Langendorff perfusion system and perfused (3 mL/min, at 37 °C), firstly with a Hanks-HEPES buffer for 5 min to be cleared from blood and then with a buffer supplemented with 1.2 mg/mL collagenase type 4 (Worthington, Lakewood, NJ, USA) for 13–18 min. Small pieces of left ventricle (LV) were dissected and mechanically dissociated. The Ca<sup>2+</sup> concentration was gradually increased to 1 mM Ca<sup>2+</sup> and cells were used within the day. Experiments were performed in Tyrode solution, with 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>.

### 2.2. Fluorimetric detection of intracellular sinapine

The sinapine entry in the cardiomyocytes was measured using the sinapine autofluorescence. The cardiomyocytes were maintained in a laminin-coated Petri dish on a microscope stage (Axiovert, Zeiss, Germany; 20× objective). Cells were illuminated at 340 nm, using a lambda DG-4 excitation system (Sutter Instrument Company, CA, USA). Images were then captured digitally every 0.35 s with a cooled CCD camera (Photometrics, Roper scientific, France) programmed for 450 nm emission. Changes in fluorescence after correction for background were analyzed with the Metafluor software (Universal Imaging Corporation, USA).

### 2.3. HPLC quantification of cytosolic and mitochondrial levels of sinapine and sinapic acid

Antioxidants were also quantified in cardiomyocytes using a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). Cardiomyocytes (100,000 cells/mL) were incubated in Tyrode for 1 or 2 h with different concentrations of sinapine (2, 20, and 60 μM) or sinapic acid (2, 20, and 60 μM). Extracellular, cytosolic and mitochondrial fractions were obtained and frozen in liquid nitrogen until HPLC measurement. After incubation, cells were pelleted by gravity and the supernatants collected for the extracellular fraction. The pellet of cells was rinsed twice in Tyrode. Cells were incubated with PBS containing digitonin (5 mg/mL) for 10 min on ice. Cells were then centrifuged at 10,000 g for 20 min at 4 °C, and the supernatants, consisting in the cytosolic fraction, was collected. The mitochondrial fraction was gathered after rinsing the pellets five times in PBS, to avoid the contamination of the cytosolic fraction.

These different fractions were then analyzed using an Agilent Poroshell EC-C18 120, 2.7 μm, 2.1 × 150 mm analytical column on an Agilent 1290 Infinity II series pump. Injection volume was 1 μL. HPLC flow rate was 0.3 mL/min with the following mobile phases: water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The gradient was as follows: 0.0–3.0 min 0–30% B, 3.0–7.0 min 30–60% B, then a stabilization step of 4 min at the initial condition. Autosampler tray temperature was set to 10 °C and column temperature was set to 25 °C. Detection was performed with an Agilent 6420 triple quadrupole in positive ionization mode with ESI source, gas temperature 325 °C, gas flow 9 L/min, nebulizer 35 psi, and capillary voltage 3500 V. Mass spectrometer was working in MRM mode acquisition, following the specific transition for isoproturon-d3 (internal standard 210.2- > 75.0), sinapine 310.2- > 251.1 (qualifier 175.0 and 91.0) and sinapic acid 225.1- > 207.0 (qualifier 91.0 and 65.0).

### 2.4. Antioxidant activity of sinapine and sinapic acid in cardiomyocytes

Cardiomyocytes (30,000 cells/mL) were incubated with sinapine or sinapic acid for 1 h. Thirty min before the end, a fluorogenic probe was added. We used dihydrorhodamine 123 (DHR<sub>123</sub>) to probe mitochondrial oxidative stress and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) to probe cytosolic oxidative stress. Both probes were used at 5 μM and were purchased at Invitrogen Molecular probes (Fischer

Scientific). Cells were rinsed with a Tyrode solution and distributed into a microplate to test different conditions. Some cells were stimulated with a 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Aldrich) or with a 10 μM of a complex III blocker, antimycin A (AA, Sigma Aldrich) to induce cellular mitochondrial ROS production. The microplate was immediately transferred to the microplate reader Tecan Infinite M200Pro. Fluorescence was measured at different wavelengths, every 5 min during 30 min.

### 2.5. Ischemia-reperfusion (IR) on isolated hearts

Ischemia-reperfusion on isolated hearts was performed as previously described [12]. The heart was perfused retrogradely using a Langendorff apparatus at a constant perfusion pressure (80 mmHg) and paced at 300 beats /min (Low voltage stimulator, BSL MP35 SS58L, 3 V). A non-compliant balloon was inserted into the left ventricle to monitor the LV pressure. The hearts were then stabilized during 20 min, and perfused for 45 min -with or without sinapine (60 μM), sinapic acid (60 μM) or MitoTEMPO (Sigma Aldrich, 0.1 μM)-, then subjected to global no-flow ischemia for 20 min, followed by 10 min of reperfusion. During the entire IR procedure, cardiac functional parameters were recorded (MP36R, BioPac System Inc) and coronary effluents were collected to evaluate coronary blood flow levels.

### 2.6. Measurements of ROS production by DHE staining

After 10 min of post-ischemic reperfusion, LV samples were embedded in an Optimal Cutting Temperature (OCT from Tissue-Tek) and flash-frozen in liquid nitrogen. Frozen sections were covered with 10 μM dihydroethidium (DHE) and incubated in a light-protected humidified chamber at 37 °C for 5 min. Images were obtained with a fluorescence microscope (Olympus BX60, excitation: 488 nm; emission: 610 nm) at the 3 A INRA/University of Avignon imaging facility Department. A SOD-mimetic TEMPOL (10 mM, Santa Cruz Biotechnology) was used as a negative control to confirm that the signals obtained really resulted from the ROS production.

### 2.7. Sinapine bioavailability

To evaluate plasmatic and tissue-level bioavailability of sinapine, rats received 200 mg/kg of sinapine using oral gavage. Blood samples were collected 15, 30, 60, and 120 min after sinapine administration, from the right jugular vein. Sinapine and sinapic acid were then quantified in plasma using the following procedure: plasma (50 μL) is mixed with an internal standard solution (50 μL in methanol at 10 ng/mL) and vortexed during 1 min. The solution is then centrifuged during 3 min at 12,000 rpm, and the supernatant is injected into HPLC/MS for quantification.

At the end of the procedure, the animals were sacrificed, and hearts quickly removed. The right ventricle removed, and LV samples frozen in liquid nitrogen. The LV tissue was homogenized in a 2 mL mitochondria isolation buffer (in mM: 300 sucrose, 5 TES, 0.2 EGTA; pH 7.2), using a Polytron (Ultra Turrax T25, IKA Labor Technik). The homogenate was centrifugated at 1000 g during 10 min at 4 °C. To separate the cytosolic fraction from the mitochondrial one, the supernatant was centrifugated at 12,000 g during 15 min at 4 °C, then collected (cytosolic fraction), while the pellet was gathered for mitochondria fraction. To optimize the release of mitochondria materials, the pellet was homogenized in a 2% Triton-X100 lysis buffer during 10 min on ice. To remove Triton-X100, the mitochondrial fraction was washed, then centrifuged (12,000 g for 15 min at 4 °C) and the pellet was resuspended in a mitochondria isolation buffer. The cytosolic and mitochondria fractions obtained were quickly frozen in liquid nitrogen until HPLC measurement was performed. To do so, mitochondria was extracted using the same procedure as that used for plasma. The cytosol (50 μL) was pipetted into a 10 mL volumetric flask then spiked successively with an internal standard solution (200 μL at 250 ng/mL in

methanol) and with 5 mL of methanol-water (50/50 v: v). The flask was ultrasonicated for 5 min and, once cooled down, completed up to 10 mL with methanol-water (50/50 v: v). Both the mitochondrial and the cytosolic fractions were analyzed with the LC-MS/MS procedure described above.

**Statistical analysis** Statistics were performed using the StatView 5.0 program (SAS Institute, Cary, NC). Data were expressed using the mean ± SEM. Differences were assessed with the one-way ANOVA, whenever appropriate. When significant interactions were found, a Bonferroni *post hoc* test was applied with  $p < 0.05$ . Fig. 2E; Fig. 4 and Fig. 5 statistics were obtained in a R-programming environment [13] (Available from: <https://www.R-project.org/>) and using a linear-mixed-effect model via nlme [14]. When significant interactions were found ( $p < 0.05$ ), a false discovery rate *post hoc* test was applied.

## 3. Results

### 3.1. The subcellular distribution of the sinapine and sinapic acid in cardiomyocytes

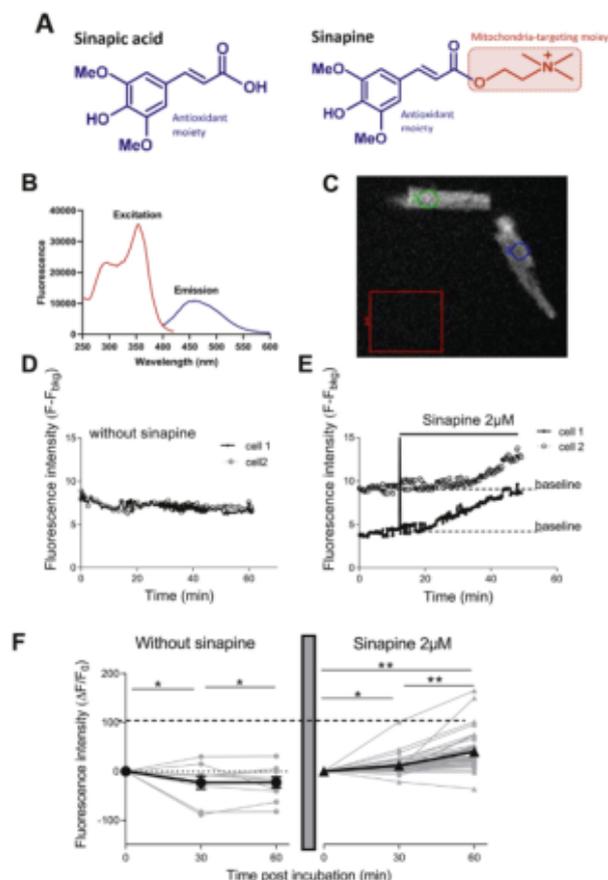
Sinapic acid has been previously reported to be an orally bioavailable phytochemical [15]. As shown in Fig. 1A, sinapine is a choline ester of the sinapic acid containing a quaternary amine that is permanently and positively charged. Much less is known about the sinapine. Whether the sinapine constituted an antioxidant that can penetrate the cardiomyocytes and target the mitochondria was unknown.

First, we evaluated whether sinapine was able to enter into freshly isolated adult cardiomyocytes. For this purpose, we used the auto-fluorescence properties of the sinapine (355 nm excitation/450 nm emission) (Fig. 1B). The fluorescence measured inside the cell (Fig. 1C) every min during 1 h decreased slightly with time, in control cells in absence of sinapine (Fig. 1D). Other cells were measured for 10 min to establish the baseline and then incubated with sinapine at a low dose (2 μM). Typically, fluorescence increased after 10–15 min, suggesting that sinapine was entering the cell (Fig. 1E–F). The fluorescence steadily increases over the 1 h-period tested (Fig. 1E–F).

To further evaluate the ability of antioxidants to accumulate into some specific myocyte compartments, in particular into the mitochondria themselves, we incubated intact cardiomyocytes with either sinapine (Fig. 2A and B) or sinapic acid (Fig. 2C and D) at three different concentrations (2, 20, 60 μM) during 1 and 2 h. The mitochondrial fraction was then separated from the cytosolic one, using a differential centrifugation. In each incubation condition and subcellular fraction, we measured the levels of both the sinapine and sinapic acid using LC-MS/MS. Indeed, it is expected that within the cells sinapine can be hydrolyzed into sinapic acid. On the contrary, normally the myocytes do not contain the sinapine esterase as in plants that can transform sinapic acid into sinapine.

After one or 2 h of incubation with sinapine, we detected into the cytosol the sinapine in a dose dependent manner, and almost no sinapic acid -indicative of minor sinapine hydrolysis (Fig. 2A). In Fig. 2B, sinapine was detected into the mitochondria, in a dose-dependent manner and similarly between 1 or 2 h of incubation. We also detected sinapic acid in this subfraction, suggesting that approximately 25% of the sinapine taken up by the mitochondria was hydrolyzed after 1 or 2 h (Fig. 2B). The duration of the incubation had no impact on cellular sinapine levels. These compounds required less than 1 h to enter cardiac cells, which is a rather rapid transport.

In Fig. 2C and D, cardiomyocytes were incubated with only sinapic acid during 1 or 2 h. We also measured sinapine and sinapic acid in both cytosol and mitochondria. However, here sinapine content measurement was used as a negative control since normally the myocytes do not transform sinapic acid into sinapine. As expected, no sinapine was detected in those conditions. The sinapic acid was detected in the cytosol of the cardiomyocytes in a dose dependent manner, in particular after 1 h (Fig. 2C). The sinapic acid level measured in the cytosol



**Fig. 1.** Entry of sinapine in cardiomyocytes. (A) Chemical structures of sinapic acid and sinapine identifying the potential antioxidant moiety in both compounds and the potential mitochondria-targeting moiety in sinapine. (B) Fluorescence spectrum of sinapine indicates a maximal excitation wavelength at 355 nm and a maximal emission wavelength at 455 nm. (C) Measurement of autofluorescence of sinapine using Metafluor System (Ex 340 nm/Em 450 nm) within cardiomyocytes after subtraction of the background in the red box 1 (F<sub>455</sub>/F<sub>340</sub>). (D–F) Example of the stability of fluorescence (Ex 340 nm/Em 450 nm) of two cardiomyocytes in absence of sinapine. (E) When cardiomyocytes are incubated with 2 μM sinapine, the fluorescence within the cell increases suggesting sinapine intracellular accumulation. (F) Fluorescence of individual control cells after 30 min and 60 min (n = 10 control cells, left panel, grey circle) and after incubation with 2 μM sinapine (n = 41 cells, right panel, grey triangle). The average fluorescence of control (black circle) and sinapine (black triangle) incubated cardiomyocytes. Linear mixed model effect: p < 0.0001; Time: p < 0.0001; Group: p < 0.0001. \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Fig. 2C) was lower than that of the sinapine (Fig. 2A). Interestingly, sinapic acid was not detected in the mitochondria, regardless of the incubation time and of the concentration. Altogether, the results indicate that, *in-vitro*, the sinapine can enter into the cardiomyocytes and localize both into the cytosol and the mitochondria, while the sinapic acid finds it more difficult to enter into the cardiomyocytes and only localizes into the cytosol.

In order to verify that the sinapine could be found into both the plasma and the cardiac tissues after some oral administration at a human-compatible dose, we then performed *in-vivo* experiments in rats. Plasmatic and tissue levels of sinapine and sinapic acid were measured 10, 30, 60, and 120 min after oral sinapine administration (200 mg/kg)

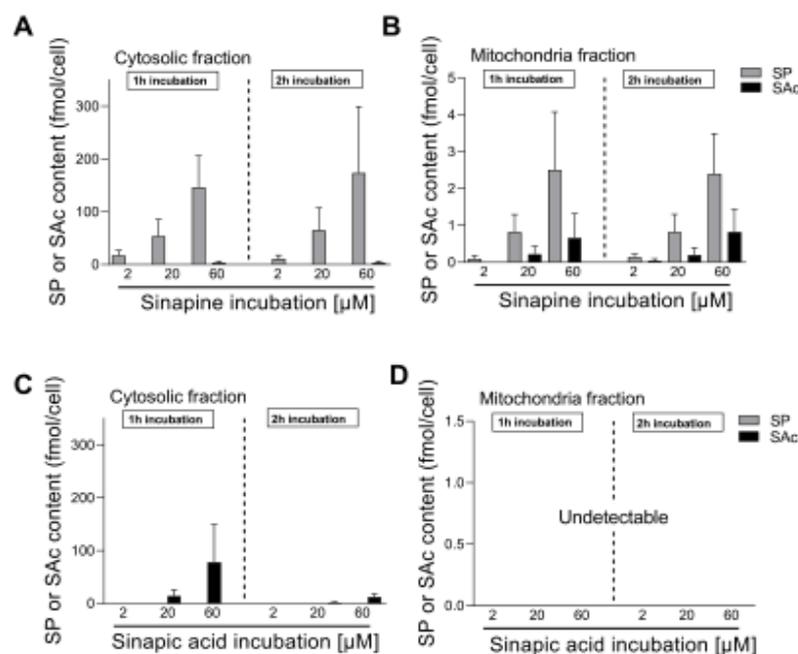
using LC-MS/MS (Fig. 3A–B). Sinapine and sinapic acid levels were detected into the plasma at all-times, pointing at a relatively stable level over the 2 h-period. We found about 5 times more sinapine-derived sinapic acid than sinapine in the plasma. About 120 min after gavage, the heart was removed, rinsed and quick-frozen into liquid nitrogen. Sinapine and sinapic acid contents were determined into the cytosolic and mitochondrial fractions as already mentioned (Fig. 3C–D). While sinapine was detected in both the cytosol and mitochondria (Fig. 3C), no sinapic acid, on the contrary, was found in any of the fractions (Fig. 3D). This showed that the orally administrated sinapine (i) is absorbed and consequently present into the blood stream, (ii) can reach the heart and, finally (iii) is able to enter both the cytosol and the mitochondria of cardiomyocytes.

### 3.2. The antioxidant activity of the sinapine against mitochondrial ROS production in isolated cardiomyocytes

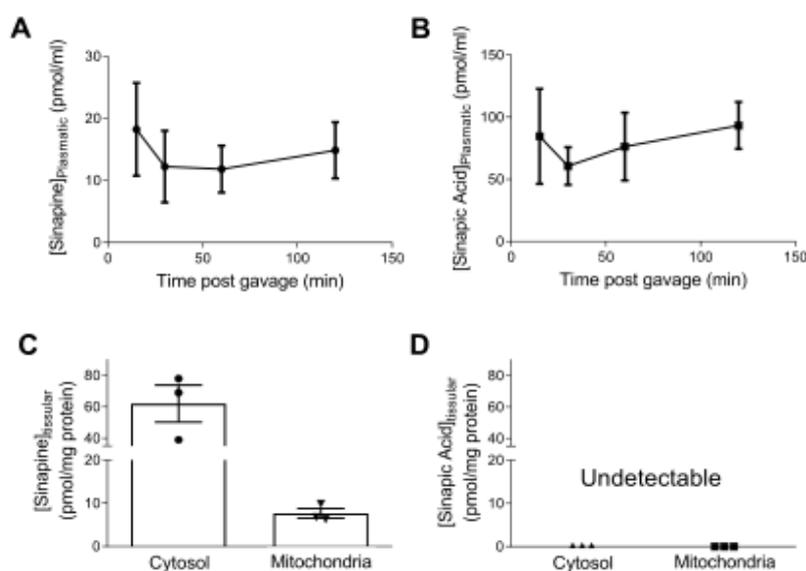
Using two *in-vitro* assays, the ORAC (oxygen radical absorbance capacity) [16] and CAT (conjugated autoxidizable triene) [17] assays, we observed that both the sinapine (cationic) and the sinapic acid (lacking the cationic moiety) exert significant antioxidant activity (Suppl Fig. 1A and 1B, respectively). Considering the ability of the sinapine to accumulate within the mitochondrial subfraction, we evaluated its propensity to limit mitochondrial oxidative stress accumulation in isolated adult rat cardiomyocytes during a global or specific mitochondrial oxidative stress (Fig. 4). Two different ROS sensitive fluorogenic probes were used to detect specifically cytosolic (H<sub>2</sub>DCF-DA) or mitochondrial (DHR<sub>123</sub>) oxidative stress [18,19]. The myocytes loaded with one of the dyes were distributed into 96-well microplate. The fluorescence was determined every 5 min during 25 min (Fig. 4A and C). Some cells were incubated with either sinapine (6 or 60 μM) or sinapic acid (60 μM) 1-h prior measurement. After each incubation, the cells were washed out. Some cells were stimulated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for a global oxidative stress or with a mitochondrial electron transport chain complex III blocker -10 μM antimycin A (AA) to force mitochondria into mtROS production [20]. Control cells (basal) i.e. without any exogenously added oxidant, showed that the fluorescence increase for both H<sub>2</sub>DCF-DA and DHR<sub>123</sub>, during 25 min to be negligible (Fig. 4A and B). For control myocytes stressed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>DCF-DA (Fig. 4A and B) and DHR<sub>123</sub> (Fig. 4C and D) the fluorescence continuously increased during 25 min, which indicates that cytosolic and mitochondrial oxidative stress occur in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In contrast, in AA-stressed control myocytes, H<sub>2</sub>DCF-DA fluorescence did not vary (Fig. 4A and B), while that of DHR<sub>123</sub> increased continuously for 25 min (Fig. 4C and D), demonstrating that only mitochondrial oxidant species are produced when myocytes are incubated with AA. We can therefore confirm, in our experimental conditions, the ability of DHR<sub>123</sub> to selectively detect mitochondrial oxidative stress and help discriminate a mitochondrial from a cytosolic one.

We then pre-incubated cardiomyocytes with some sinapine or sinapic acid before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or AA-induced stress was applied (Fig. 5). Pre-incubations with the two antioxidants alone had no impact on the fluorescence levels (Fig. 4B–D), suggesting no significant interactions between the sinapine or sinapic acid and the fluorescent probes used in the present work. When a cytosolic oxidative stress was generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, both the sinapine (6 and 60 μM) and the sinapic acid (60 μM) prevented the H<sub>2</sub>DCF-DA (Fig. 5A & B) and DHR<sub>123</sub> (Fig. 5C & D) fluorescence increase. The effect of the sinapine was a dose-dependent for the oxidative stress measured by DHR<sub>123</sub>. These results indicate that both the sinapine and the sinapic acid are efficient antioxidants when confronted to a global oxidative stress mediated by the cytosolic initiation of oxidation.

The AA conditions then allowed to test the antioxidant capacity of the sinapine and the sinapic acid under a specific mitochondrial oxidative stress. In presence of AA, the H<sub>2</sub>DCF-DA fluorescence was not affected in any condition, indicating no measurable cytosolic ROS



**Fig. 2.** Cytosol/mitochondria partitioning of sinapine and sinapic acid in cardiomyocytes. Myocytes were incubated for 1 h (left panel) or 2 h (right panel) with different concentrations of sinapine (A, B) or sinapic acid (C, D) (2, 20, and 60 μM). After fractional separation, the amounts of sinapine (grey column) or sinapic acid (black column) were measured by HPLC in the cytosol (A, C) or in isolated mitochondria (B, D). Conditions without drug incubation served as a negative control. (n = 6 experiments with sinapine, n = 4 experiments with sinapic acid).



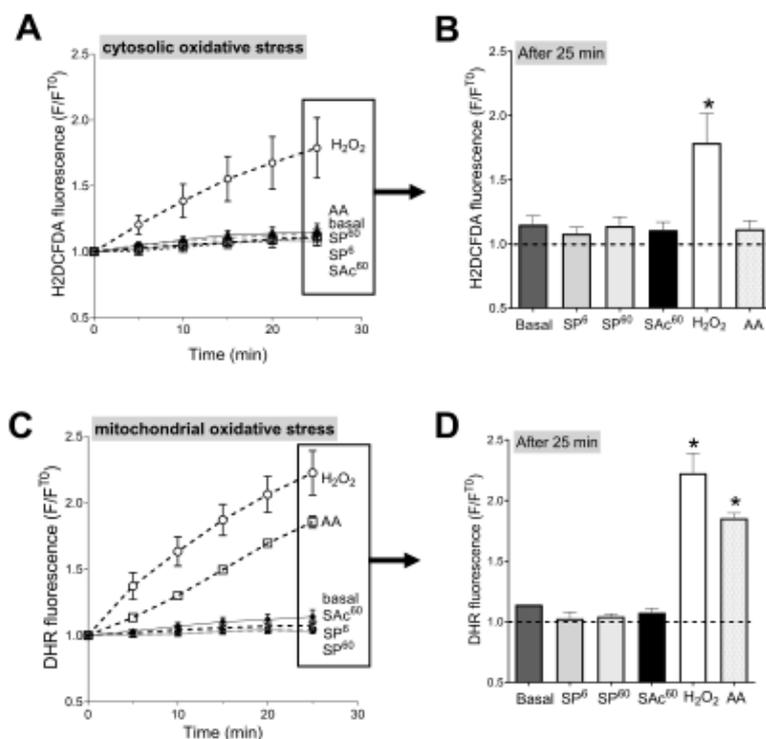
**Fig. 3.** Plasmatic and tissue levels of sinapine and sinapic acid after oral administration of sinapine (200 mg/kg) in rat. Blood samples were collected at 10, 30, 60 and 120 min after oral administration of sinapine. Plasmatic levels of sinapine (A) and sinapic acid (B) were measured by LC-MS/MS. At the end of the 120 min, the heart was removed, rinsed and frozen. Differential centrifugation was performed to separate the mitochondrial fraction from the cytosolic fraction. The level of sinapine (C) and sinapic acid (D) were measured in each cellular subfraction by LC-MS/MS (n = 3 animals).

production nor accumulation (Fig. 5A & B). On the contrary, the presence of AA induced an increase in the DHR<sub>123</sub> fluorescence, which was efficiently prevented by only the sinapine. These last results strongly suggest that only sinapine is able to target mitochondrial oxidative stress.

The differential cardioprotective impact of the sinapine and sinapic acid in an isolated heart model for ischemia reperfusion.

We hereby evaluated whether the sinapine can protect the whole heart following an ischemic stress, using the standard global ischemia-reperfusion model in perfused isolated hearts (Fig. 6). In this model, mitochondrial oxidative stress is a key trigger of cardiac injuries and

dysfunctions [21]. The potential cardioprotective effect of the sinapine (60 μM) was compared to that of the sinapic acid (60 μM) and to a known synthetic mtROS scavenger, the mitoTEMPO (MitoT, 0.1 μM) [22]. No major modification was observed during the ischemic phase with the different compounds. Typically, after 10 min reperfusion, the heart does not fully recover when compared with the baseline level. This is illustrated by an approximate 30% recovery only of the developed pressure (Pdev) (Fig. 6A and B), the maximal and minimal first derivative of the left intraventricular pressure (dP/dt<sub>max</sub> and dP/dt<sub>min</sub>, respectively) in control hearts. The Pdev (Fig. 6B) and dP/dt<sub>max</sub> (Fig. 6C) recovery levels increased significantly up to 44–50% in



**Fig. 4.**  $\text{H}_2\text{O}_2$  and antimycin A-induced oxidative stress in cardiomyocytes. Cardiomyocytes were loaded with fluorogenic dyes sensitive to ROS production.  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  dye (A, B) probes oxidative stress within the cytosol. Dihydrorhodamine 123 (DHR<sub>123</sub>) dye (C, D) probes oxidative stress within the mitochondria. Fluorescence was measured every 5 min and was normalized by baseline fluorescence ( $T_0$ ) (A, C). In control cells (basal), the fluorescence increases modestly during the 25 min-period. Some myocytes were incubated for 1 h with either 6  $\mu\text{M}$  of sinapine ( $\text{SP}^6$ ), 60  $\mu\text{M}$  of sinapine ( $\text{SP}^{60}$ ) or 60  $\mu\text{M}$  of sinapic acid ( $\text{SAc}^{60}$ ) prior to measurement. Some cells were stimulated with 0.1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  or with a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, antimycin A (AA, 10  $\mu\text{M}$ ) to force mitochondria to produce ROS. The fluorescence in each condition was compared with control cells (basal). (B, D) Representative average fluorescence after 25 min from graphs A and C. (n = 4 animals) (A, B) Linear mixed model effect: Time:  $p < 0.001$ , Group:  $p = 0.0139$ , Time-Group:  $p < 0.001$ . (C, D) Linear mixed model effect: Time:  $p < 0.001$ , Group:  $p < 0.001$ , Time-Group:  $p < 0.001$ . \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ .

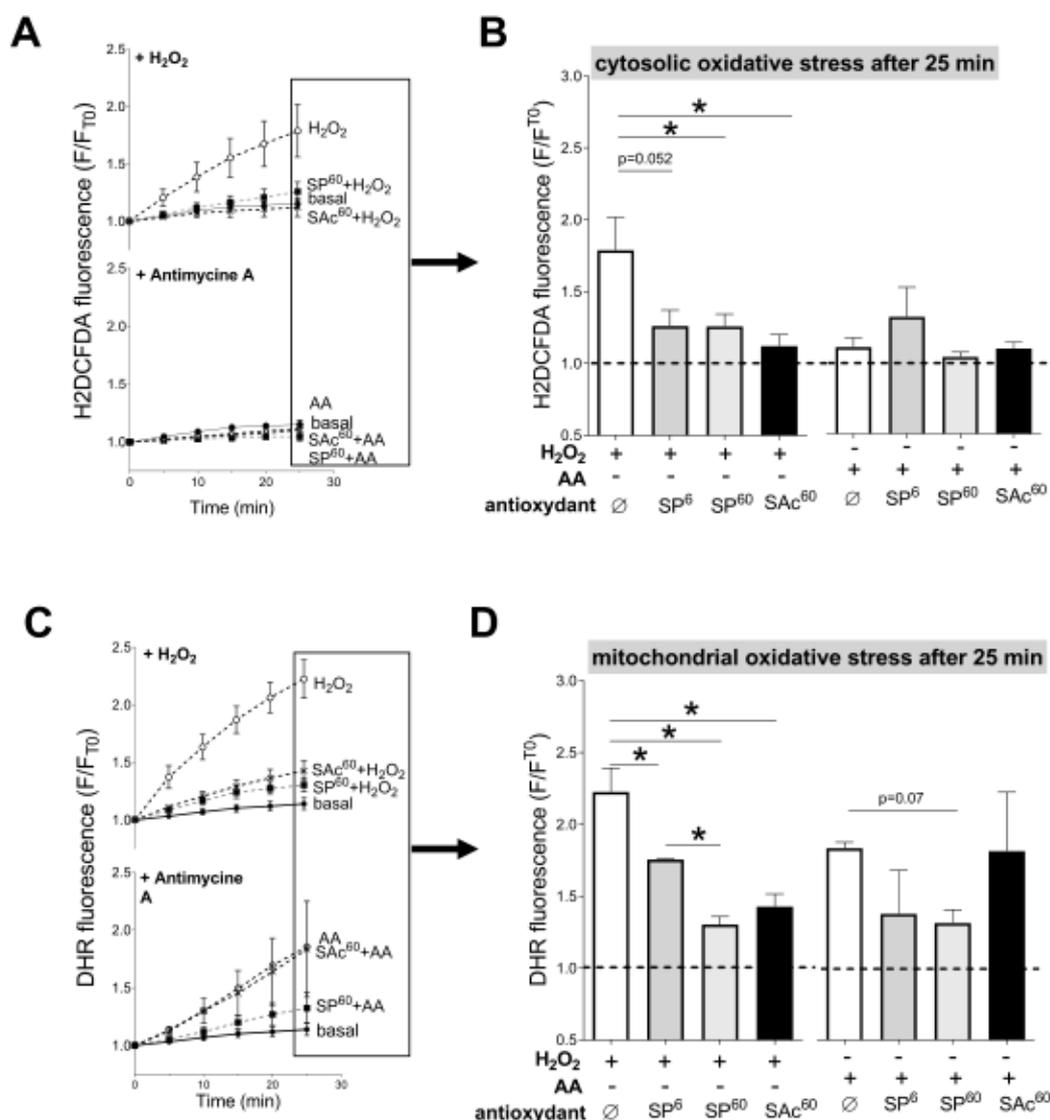
presence of the mitoTEMPO, indicating a cardioprotection induced by the drug. The relaxation phase,  $dP/dt_{min}$  (Fig. 6D) was not affected by the mitoTEMPO. Interestingly, the cardioprotective effects induced by the sinapine were larger, with a parameters recovery reaching 60–70%. By contrast, the sinapic acid treatment had no effect on any recovery parameter when compared with control hearts. These functional results were related with ROS levels produced within the tissues after ischemia-reperfusion and measured by DHE staining on cardiac tissue (Fig. 6E). We observed that the mitoTEMPO reduced significantly DHE fluorescence when compared to control tissue, -by 24 %- indicating lower ROS accumulation during ischemia-reperfusion. Pre-treated sinapine hearts produced even less ROS, since DHE staining was reduced by 45%, when compared to control hearts. The sinapic acid had limited effects on ROS production and did not differ from the control tissues. Altogether, the results indicate that targeting mitochondrial oxidative stress can be used as a cardioprotective strategy that can be achieved using sinapine.

#### 4. Discussion

In this study, we showed that the sinapine, a natural phenolic antioxidant bearing a permanent positive charge, can *in-vivo* and *in-vitro* penetrate cardiomyocytes. Despite its hydrophilicity, the sinapine can (i) localize within the cytosol and mitochondria, (ii) decrease the level of mitochondrial oxidative stress, (iii) improve cardiac functional recovery and limit ROS production during post-ischemic reperfusion.

Today, using the highly negative inner membrane potential of the mitochondria as an electromotive driving force to attract cationic molecules appears as an efficient strategy to target effectively the mitochondria with antioxidants, nitric oxide liberating molecules and probes (for review [23]). Such a negative membrane potential is not found in any other subcellular compartments and thus constitutes a

very selective way to deliver compounds to these organelles. However, it is generally considered that the uptake of cations by the mitochondria is not only caused by the positive charge of the cation, but also by its hydrophobicity [24]. For example, the hydrophobicity of the tetraphenylphosphonium or that of the triphenylmethyl phosphonium is supposed to help them pass easily through the phospholipid bilayers of the mitochondria [8]. This pattern actually contrasts with that of the hydrophilic cations which cannot easily cross biological membranes, except when transport is facilitated by some ionophores or carrier proteins [24]. The relative impermeability of biological membranes to hydrophilic cations is supposedly largely due to the high demand in energy when moving an ion from an aqueous environment to the non-polar lipid interior of the membrane. Most mitochondriotropic antioxidants developed so far are therefore lipophilic cations. In our work we measured the partition of the sinapine, the sinapic acid, and the MitoTempo, a commercially available SOD mimetic with mitochondrial tropism, between a lipid phase and an aqueous phase, using a biphasic octan-1-ol/water mixture. As previously reported with other molecules bearing a choline ester group [9], sinapine is highly hydrophilic. Indeed,  $\text{LogD}$  (pH 7.0) used to evaluate its partition between the lipid and aqueous phases, is highly negative, meaning that the sinapine is almost totally distributed (> 99.8%) in the aqueous phase. The sinapic acid can also be considered as hydrophilic, though to a lesser extent, while MitoTempo is amphiphilic and several MitoQ (MitoQ3, MitoQ5 and MitoQ10) whose  $\text{LogP}$  value is given in literature [25] are lipophilic (Suppl Fig. 1C). In our work, despite its strong hydrophilicity, the sinapine is able (i) to cross cell membranes and distribute into blood plasma after an oral administration, (ii) to be present in the cytosol of cardiac myocytes and (iii) finally, to be significantly taken up by the mitochondria. Interestingly, the sinapic acid, which is less hydrophilic than the sinapine ( $\text{LogD}$  (pH7.0) - 0.9 vs. - 3.0, respectively), crossed cellular membranes with less efficiency when incubated with

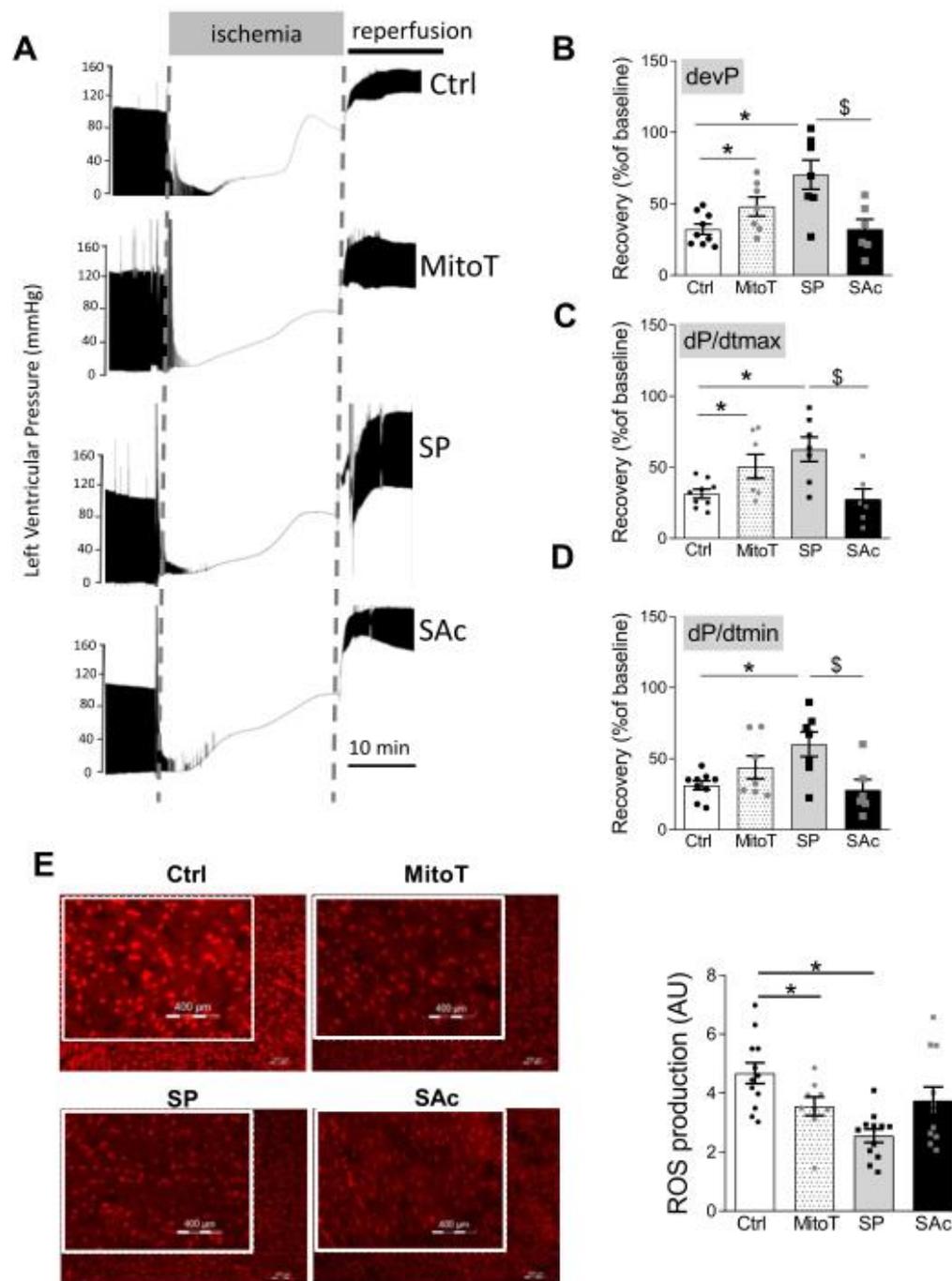


**Fig. 5.** Effect of sinapine and sinapic acid on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antimycin A-induced oxidative stress in cardiomyocytes. Cardiomyocytes were loaded with fluorescent dyes sensitive to ROS production. H<sub>2</sub>DCF-DA dye (A, B) probes oxidative stress within the cytosol. Dihydrorhodamine 123 (DHR<sub>123</sub>) dye (C, D) probes oxidative stress within the mitochondria. Fluorescence was measured every 5 min and was normalized by the baseline fluorescence (T<sub>0</sub>) (A, C). Cardiomyocytes were stimulated with 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or with a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, antimycin A (AA, 10 μM) to force mitochondria to produce ROS. Some myocytes were incubated for 1 h with either 6 μM of sinapine (SP<sup>6</sup>), 60 μM of sinapine (SP<sup>60</sup>) or 60 μM of sinapic acid (SAc<sup>60</sup>) prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AA stimulation. The fluorescence in each condition was compared with control cells (basal). (B, D) Representative average fluorescence after 25 min from graphs A and C. \*, p < 0.05 vs basal condition, (A, B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Linear mixed model effect: Time: p < 0.001, Group: p = 0.0102, Time-Group: p < 0.001. Antimycin A: Time: p < 0.001, Group: p = 0.603, Time-Group: p = 0.528. (C, D) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Linear mixed model effect: Time: p < 0.001, Group: p = 0.0102, Time-Group: p < 0.001. Antimycin A: Time: p < 0.001, Group: p = 0.0016, Time-Group: p < 0.001. \*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01.

cardiomyocytes than the sinapine at the same concentration levels (Fig. 2). Even more interesting is the observation made on the sinapic acid not being taken up by the mitochondria (Fig. 2D). These results based on subcellular fractionation were confirmed by the ability of the sinapine, but not of the sinapic acid, to prevent mitochondrial oxidative stress in presence of the AA (Fig. 5D). This also confirms that the choline moiety of the sinapine, together with its positive charge, is the main molecular determinant of the sinapine ability to enter into the mitochondria.

The energy barrier to enter mitochondria for hydrophilic

compounds (whether or not they are cationic) is considered too high to allow for passive penetration. If the sinapine cannot enter passively into the mitochondria, it requires certainly a shuttle system. Several shuttle systems have been described to carry molecules into the mitochondria. The sinapine contains a positively charged choline moiety. Some hydrophilic cations such as metformin are taken up by specific mitochondrial cationic transporters to diffuse across the mitochondrial membranes [23]. Similarly, carnitine, that is a quaternary ammonium compound and is considered as chemical analogue of choline, is pushed into the mitochondrial matrix by a Carnitine Acyl-Carnitine Translocase



**Fig. 6.** Effect of sinapine and sinapic acid on cardiac functions following ischemia-reperfusion stress. (A) Examples of LV pressure during the ischemia-reperfusion protocol of the isolated heart perfused retrogradely using a Langendorff apparatus. Hearts were stabilized for 20 min and then perfused for 45 min with or without sinapic acid (SAC 60  $\mu$ M), sinapine (SP 60  $\mu$ M) or MitoTEMPO (MitoT). Hearts were subjected to global no-flow ischemia for 20 min followed by 10 min of reperfusion. (B–D) Recovery of the developed pressure (Pdev), the maximal and minimal first derivative of left intraventricular pressure (dP/dtmax and dP/dtmin, respectively) 10 min post-IR. Values are normalized to the baseline level. (E) Determination of ROS production by DHE staining 10 min after IR, in hearts pre-treated or not with MitoTEMPO (0.1  $\mu$ M), sinapine (60  $\mu$ M), or sinapic acid (SAC, 60  $\mu$ M). Scale bar = 400  $\mu$ m, (n = 12 control hearts, n = 9 MitoTEMPO hearts, n = 12 sinapine hearts, n = 11 sinapic acid heart). \*p < 0.05.

[26]. Moreover, both cellular membranes and mitochondria contain choline transporters like-proteins (CTL1 and CTL2) responsible for the uptake of extracellular choline and organic cations [27]. CTL1 has been identified in heart tissue [28]. Thus, we speculate that thanks to structural homology, one of these carriers may facilitate the sinapine entry into the mitochondria and not the sinapic acid. Obviously, more experiments are required to determine exactly how the sinapine accumulates into the mitochondria. Alternatively, our results suggest that the hydrophilicity of a cation is not necessarily a limiting factor for its mitochondrial tropism. To the best of our knowledge, sinapine thus appears as the first reported natural hydrophilic free radical scavenger that can target cardiac mitochondria.

Another key result of this work is that sinapine is more efficient to improve cardiac functional recovery and reduce ROS production during post-ischemic reperfusion than sinapic acid, despite showing a slightly lower antioxidant activity (Suppl Fig. 1). It is now widely accepted that major damaging events during ischemic tissue reperfusion are due to some mtROS production burst during the first minute of post-ischemic reperfusion [29]. Indeed, mtROS can trigger oxidative damages and also, in a complex interplay with mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload, promote the activation of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). This activation leads to the inhibition of the mitochondrial respiration and further cell death (for review [30]). In addition, mPTP activation also contributes to the mtROS production increase in a "ROS-induced ROS release" [31]. In the present study, the sinapine ability to specifically blunt mtROS accumulation can explain its higher efficiency over the sinapic acid. Other compounds used to target mtROS production, such as the mitoQ can reduce efficiently the heart sensitivity to IR [32]. In conditions mimicking the ischemia-reperfusion, the MitoTEMPO, a SOD mimetic TEMPOL moiety covalently conjugated to the lipophilic cation triphenylphosphonium, is also able to preserve mitochondrial integrity and attenuate necrosis and apoptosis to the same extent as SOD1 overexpression [33]. The MitoTEMPO can protect the cardiovascular system against hypertension, whereas the use of a similar dose of the non-targeted TEMPOL is ineffective [2]. This is in line with our differential results between the sinapine and sinapic acid, which indicate that targeting mitochondria is crucial for some pathologies. In our work, the perfusion of isolated hearts with the MitoTEMPO at concentration levels previously used to limit cardiac mtROS production [34], was also able to protect the heart during ischemia-reperfusion and to reduce global ROS production. This result, associated with the fact that the sinapine is prompter than the sinapic acid to protect the heart during IR, confirmed the key role of mitochondrial oxidative stress in IR injuries. Indeed, despite the fact that other sources of ROS may also contribute to IR injuries, like the xanthine oxidase, uncoupled nitric oxide synthase and NADPH oxidase [35,36] for example, the mtROS are considered as a precursor of cardiac IR injuries [37]. Accordingly, targeting specifically mitochondrial ROS production with mitoQ, which is established as a mitochondrial superoxide scavenger [38], has been reported to delay mPTP opening and improve cell survival in isolated cardiomyocytes subjected to hypoxia-reoxygenation [39] and also to provide an efficient strategy to limit IR injuries [32]. However, we cannot exclude in our work that the dual distribution of the sinapine in, both the cytosol and the mitochondria, could also contribute to its beneficial impact on cardio protection. The mitochondrial fraction of the sinapine molecules could inhibit the early phase of the mitochondrial oxidative stress, observed during the first minutes of the reperfusion, while the cytosolic fraction could limit the activation of other cellular oxidative pathways. Further studies will be needed to investigate this hypothesis.

The nature of the antioxidant mechanisms of the sinapine also remains to be explored. The fluorogenic probes used in our study detect changes in oxidative stress but are not informative for the exact nature of the radicals due to lack of ROS specificity. We can only rely on previous studies that explored the radical scavenging capacities of the sinapic acid toward superoxide or hydroxyl radical [15]. Considering

that both the sinapine and the sinapic acid share the same syringyl moiety responsible for the antioxidant action, we could speculate that the sinapine has also the ability to reduce those free radicals, which limit mitochondrial oxidative stress. Moreover, we cannot exclude that the beneficial effects of the sinapine are mediated by interactions with complexes of the mitochondrial ETC and decrease of ROS production. Indeed, some polyphenol extracts (flavonoids) have been found to inhibit ETC complexes in intact mitochondria [40]. However, another phenolic antioxidant, xanthohumol, induces generation of ROS and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial ETC complex I in human lung cancer cells [41]. Thus, indirect antioxidant effects of the sinapine resulting from its potential interaction with some mitochondrial ETC complexes cannot be excluded.

**Study limitation:** A limitation of our work is that we tested the use of the sinapine in a cardiac ischemic reperfusion injury model. However other pathological conditions associated with increased mitochondrial oxidative stress, include, but are not limited to cancer [42], heart failure [43], peripheral artery diseases [44], hyperglycemia [45], diabetes [46,47], insulin resistance, neurodegenerative diseases [48], chronic obstructive pulmonary diseases [49], hypertension [2] and inflammatory diseases [50] and could be explored. Finally, to further confirm the ability of sinapine to protect the heart, the therapeutic dose must be determined.

## 5. Conclusion

In summary, we hereby show that a phenolic antioxidant like the sinapine, bearing a permanent positive charge and partitioning almost totally (> 99.8%) into the aqueous phase of a biphasic octan-1-ol/water mixture, can (i) enter into cells and mitochondria, (ii) selectively decrease the level of the mitochondrial reactive species in cardiomyocytes, and (iii) protect the heart against a severe ischemic stress involving mitochondrial defects. The fact that this particular antioxidant is obtainable from natural sources like the rapeseed or mustard, that it is bioavailable and distributes readily to the heart, raises the question of its potential usage in diets and of its nutritional effects. Our findings pave the way for a more systematic search on antioxidants targeting mitochondria in our diet, a strategy that has never been addressed before, to our knowledge. Yet, this could presumably help us identify a hitherto overlooked subfamily of food antioxidants (if any) with a considerable impact for future nutrition patterns. When these compounds are not provided by our diet, some dietary supplementations -based on sinapine or other phenolic choline esters-could then appear to be a promising nutritional alternative.

## Declaration of competing interest

The authors have declared no conflict of interest. Naturex is involved in the research of new ingredients for the food and nutraceutical industry.

## Acknowledgements

This work was supported by a PhD grant to D.B from the SFR Tersys and by a PhD mobility grant to D.B from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire. We thank Dr. Anne Virsolvy for the technical help with the fluorimetric detection of intracellular sinapine, Ms. Céline Gérin for LogP measurements, and Ms. Pascale Bellenger for HPLC determination of sinapine and sinapic acid in biological samples.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101554>.

## References

- [1] A.C. Bulua, A. Simon, R. Maddipati, M. Pelletier, H. Park, K.-Y. Kim, M.N. Sack, D.L. Kastner, R.M. Siegel, Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFRI-associated periodic syndrome (TRAPS), *J. Exp. Med.* 208 (2011) 519–533, <https://doi.org/10.1084/jem.20102049>.
- [2] A.E. Dikalova, A.T. Bikineyeva, K. Budzyn, R.R. Nazarewicz, L. McCann, W. Lewis, D.G. Harrison, S.I. Dikalov, Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension, *Circ. Res.* 107 (2010) 106–116, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601>.
- [3] J.Q. Kwong, J.D. Molkentin, Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart, *Cell Metabol.* 21 (2015) 206–214, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>.
- [4] E.A. Liberman, V.P. Topaly, L.M. Tsofina, A.A. Jasaitis, V.P. Skulachev, Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature* 222 (1969) 1076–1078, <https://doi.org/10.1038/2221076a0>.
- [5] G.F. Kelso, C.M. Porteous, C.V. Coulter, G. Hughes, W.K. Porteous, E.C. Ledgerwood, R.A. Smith, M.P. Murphy, Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 4588–4596, <https://doi.org/10.1074/jbc.M009093200>.
- [6] R.A. Smith, C.M. Porteous, C.V. Coulter, M.P. Murphy, Selective targeting of an antioxidant to mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 709–716, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00543.x>.
- [7] A.E. Vendrov, K.C. Vendrov, A. Smith, J. Yuan, A. Sumida, J. Rohidoux, M.S. Runge, N.R. Madamanchi, NOX4 NADPH oxidase-dependent mitochondrial oxidative stress in aging-associated cardiovascular disease, *Antioxidants Redox Signal.* 23 (2015) 1389–1409, <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6221>.
- [8] M.P. Murphy, Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 326–330, [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01068-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01068-8).
- [9] S.-S. Shesha, D. Nauduri, M.W. Anders, Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1762 (2006) 256–265, <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2005.10.007>.
- [10] J.S. Armstrong, Mitochondrial Medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease: pharmacological targeting of mitochondria, *Br. J. Pharmacol.* 151 (2009) 1154–1165, <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707288>.
- [11] O. Cazorla, S. Szilagyi, J.-Y. Le Guennec, G. Vassort, A. Lacampagne, Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction, *FASEB J.* 19 (2005) 88–90, <https://doi.org/10.1096/fj.04-2066fje>.
- [12] C. Farah, A. Kleindienst, G. Bolea, G. Meyer, S. Gayraud, B. Geny, P. Obert, O. Cazorla, S. Tanguy, C. Reboul, Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites, *Basic Res. Cardiol.* 108 (2013) 389, <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0389-2>.
- [13] R: a language and environment for statistical computing, n.d. <https://www.gbif.org/fr/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>, Accessed date: 12 November 2019.
- [14] Nlme citation info, (n.d.), <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/citation.html>, Accessed date: 15 November 2019.
- [15] C. Chen, Sinapic acid and its derivatives as medicine in oxidative stress-induced diseases and aging, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1155/2016/3571614>.
- [16] B. Ou, T. Chang, D. Huang, R.L. Prior, Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: first Action 2012.23, *J. AOAC Int.* 96 (2013) 1372–1376, <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>.
- [17] M. Laguerre, L.J. López-Giraldo, J. Lecomte, B. Baréa, E. Cambon, P.F. Tchobo, N. Barouh, P. Villeneuve, Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe, *Anal. Biochem.* 380 (2008) 282–290, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.06.006>.
- [18] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J.A. Davies, P.A. Dennery, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts, H. Ischiropoulos, Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- [19] R.J. Mark, J.N. Keller, I. Kruman, M.P. Mattson, Basic FGF attenuates amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampal neurons, *Brain Res.* 756 (1997) 205–214, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00196-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00196-0).
- [20] C.L. Quinlan, A.A. Gerencser, J.R. Treberg, M.D. Brand, The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 31361–31372, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.267898>.
- [21] S. Cadenas, ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection, *Free Radic. Biol. Med.* 117 (2018) 76–89, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024>.
- [22] R. Ni, T. Cao, S. Xiong, J. Ma, G.-C. Fan, J.C. Lacefield, Y. Lu, S.L. Tisser, T. Peng, Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy, *Free Radic. Biol. Med.* 90 (2016) 12–23, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.013>.
- [23] J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaraman, Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications, *Chem. Rev.* 117 (2017) 10043–10120, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>.
- [24] M.F. Ross, G.F. Kelso, F.H. Blaikie, A.M. James, H.M. Cochemé, A. Filipovska, T. Da Ros, T.R. Hurd, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (2005) 222–230, <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0104-5>.
- [25] A.M. James, H.M. Cochemé, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21295–21312, <https://doi.org/10.1074/jbc.M501527200>.
- [26] S.V. Pande, A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 72 (1975) 883–887, <https://doi.org/10.1073/pnas.72.3.883>.
- [27] B. Iwao, M. Yara, N. Hara, Y. Kawai, T. Yamanaka, H. Nishihara, T. Inoue, M. Inazu, Functional expression of choline transporter like-protein 1 (CTL1) and CTL2 in human brain microvascular endothelial cells, *Neurochem. Int.* 93 (2016) 40–50, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.12.011>.
- [28] V. Hedtke, M. Bakovic, Choline transport for phospholipid synthesis: an emerging role of choline transporter-like protein 1, *Exp. Biol. Med.* 244 (2019) 655–662, <https://doi.org/10.1177/1535370219830997>.
- [29] E.T. Chouchani, V.R. Pell, A.M. James, L.M. Work, K. Saeb-Parsy, C. Frezza, T. Krieg, M.P. Murphy, A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury, *Cell Metabol.* 23 (2016) 254–263, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009>.
- [30] K.A. Webster, Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species, *Future Cardiol.* 8 (2012) 863–884, <https://doi.org/10.2217/fca.12.58>.
- [31] D.B. Zorov, C.R. Filburn, L.O. Klotz, J.L. Zweier, S.J. Sollott, Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1001–1014.
- [32] V.J. Adlam, J.C. Harrison, C.M. Porteous, A.M. James, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, I.A. Sammut, Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury, *FASEB J.* 19 (2005) 1088–1095, <https://doi.org/10.1096/fj.05-3718com>.
- [33] H. Liang, F. Sedlic, Z. Bosnjak, V. Nilakantan, SOD1 and MitoTEMPO partially prevent mitochondrial permeability transition pore opening, necrosis, and mitochondrial apoptosis after ATP depletion recovery, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1550–1560, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.018>.
- [34] Y. Olgar, S. Degirmenci, A. Durak, D. Billur, B. Can, G. Kayki-Mutlu, E. Arioglu-Inan, E. B. Turan, Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance, *Exp. Gerontol.* 110 (2018) 172–181, <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.06.012>.
- [35] S.L. Linas, D. Whittenburg, J.E. Repline, Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury, *Am. J. Physiol.* 258 (1990) F711–F716, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.258.3.F711>.
- [36] V. Brauersreuther, F. Montecucco, M. Asrih, M. Ashri, G. Pelli, K. Galan, M. Frias, F. Burger, A.L.G. Quinader, C. Montessuit, K.-H. Krause, F. Mach, V. Jaquet, Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 64 (2013) 99–107, <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.007>.
- [37] A.Y. Abramov, A. Scorziello, M.R. Duchon, Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27 (2007) 1129–1138, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4468-06.2007>.
- [38] R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1201 (2010) 96–103, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05627.x>.
- [39] M.J. Hansson, O. Llwyd, D. Morin, D. de Paulis, T. Arnoux, C. Gouarné, S. Koul, H. Engblom, T. Bordet, R. Tissier, H. Arheden, D. Erlinge, A.P. Halestrap, A. Berdeux, R.M. Pruss, S. Schaller, Differences in the profile of protection afforded by TRO40303 and mild hypothermia in models of cardiac ischemia/reperfusion injury, *Eur. J. Pharmacol.* 760 (2015) 7–19, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.009>.
- [40] H. Moini, A. Arroyo, J. Vaya, L. Packer, Bioflavonoid effects on the mitochondrial respiratory electron transport chain and cytochrome c redox state, *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 4 (1999) 35–41, <https://doi.org/10.1179/135100999101534729>.
- [41] B. Zhang, W. Chu, P. Wei, Y. Liu, T. Wei, Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 486–497, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.09.021>.
- [42] S.S. Sabharwal, P.T. Schumacker, Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Canc.* 14 (2014) 709–721, <https://doi.org/10.1038/nrc3803>.
- [43] T. Ide, H. Tsutsui, S. Kinugawa, H. Utsumi, D. Kang, N. Hattori, K. Uchida, K. I. Arimura, K. Egashira, A. Takeshita, Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium, *Circ. Res.* 85 (1999) 357–363, <https://doi.org/10.1161/01.res.85.4.357>.
- [44] C.R. Hart, G. Layec, J.D. Trinity, O.S. Kwon, J. Zhao, V.R. Reese, J.R. Gifford, R.S. Richardson, Increased skeletal muscle mitochondrial free radical production in peripheral arterial disease despite preserved mitochondrial respiratory capacity, *Exp. Physiol.* 103 (2018) 838–850, <https://doi.org/10.1113/EP086905>.
- [45] T. Nishikawa, D. Edelstein, X.L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kameda, M.A. Yorek, D. Beebe, P.J. Oates, H.P. Hammes, I. Giardino, M. Brownlee, Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage, *Nature* 404 (2000) 787–790, <https://doi.org/10.1038/>

- 35008121.
- [46] C. Bonnard, A. Durand, S. Peyrol, E. Chanseume, M.-A. Chauvin, B. Morio, H. Vidal, J. Rieusset, Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 789–800, <https://doi.org/10.1172/JCI32601>.
- [47] H. Bugger, E.D. Abel, Mitochondria in the diabetic heart, *Cardiovasc. Res.* 88 (2010) 229–240, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq239>.
- [48] S. Kausar, F. Wang, H. Cui, The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases, *Cells* 7 (2018), <https://doi.org/10.3390/cells7120274>.
- [49] L. Puente-Maestu, J. Pérez-Parra, R. Godoy, N. Moreno, A. Tejedor, F. González-Aragoneses, J.-L. Bravo, F.V. Álvarez, S. Camaño, A. Agustí, Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients, *Eur. Respir. J.* 33 (2009) 1045–1052, <https://doi.org/10.1183/09031936.00112408>.
- [50] G. Looer, J. Kondapalli, H. Iwase, N.S. Chandel, G.B. Waypa, R.D. Guzy, T.L. Vanden Hoek, P.T. Schumacker, Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 1382–1394, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.008>.

## 5. Données supplémentaires

### Antioxidant activity measurement using the ORAC assay

Experiments were conducted following the procedure of Ou et al. (Ou et al., 2013), wherein pure sinapine (Fortochem Technology Limited, Hong Kong) and sinapic acid (Sigma Aldrich) are solubilized in 50:50 (v/v) acetone : water mixture. Dilutions were prepared in a phosphate buffer saline (PBS, 75 mM, pH 7.0) for each tested molecule. Twenty-five microliters of these solutions and PBS alone (blank) were transferred into a 96-well microplate (BRAND, Germany). The plate was refrigerated, then introduced into the reader (Infinite, Tecan, Switzerland). A solution containing 150  $\mu$ L of fluorescein (0.1 M) was added into each well. The plate was shaken for 8 s (2 mm amplitude) and incubated for 30 min at 37 °C. After zero value measurement, 25  $\mu$ L of peroxy radical generator (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH solution (152 mM), were added into each well, and the decrease of fluorescein fluorescence (Excitation: 485 nm/emission: 535 nm) was monitored for 90 min every 90 s (60 measurements). The antioxidant value of a sample was calculated measuring the difference between the area under the curve of the sample and that of a blank without antioxidant. This gave the net area under the curve (AUC), which was then plotted on a graph as a concentration function. The slope of the linear part was then divided by the slope of the Trolox (standard) and calculated in the same conditions and analyzed on the same microplate. ORAC values were expressed as mol Trolox equivalent/mol of molecule.

### Antioxidant activity measurement using the CAT assay

These experiments were conducted following the Laguerre et al. procedure (Laguerre et al., 2008), wherein sinapine and sinapic acid were solubilized in 100  $\mu$ L DMSO, and then in 50:50 (v/v) acetone water mixture, at the desired concentration. Dilutions were then prepared in a phosphate buffer saline (PBS, 75 mM, pH 7.0) for each tested molecule. Fifty microliters of these solutions and PBS alone (blank) were transferred automatically into a 96-well microplate (Greiner, Austria). The plate was refrigerated (6 °C) before the sequence.

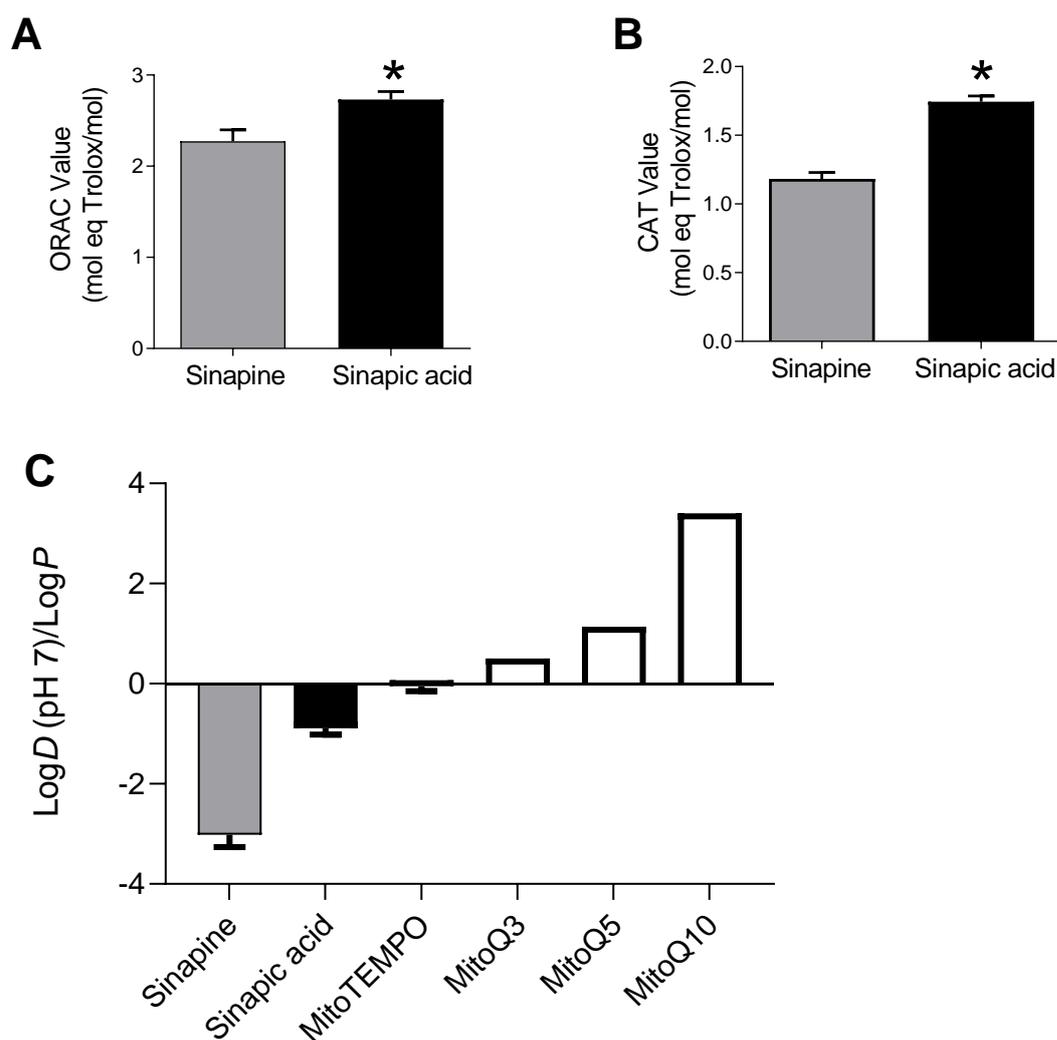
To prepare the tung oil in-water emulsion, twenty-five milliliters of a PBS solution -containing 34  $\mu\text{M}$  Brij 35 (neutral emulsifier, estimated MW= 1198 g/mol)- were added to the 8 mg tung oil in a brown glass flask. This mixture was vortexed for 10 s, before its homogenization (Ultra Turrax), at approximately 2400 rpm for 90 s.

After introducing the microplate in the reader (Infinite, Tecan, Switzerland) and after 4 min of incubation at 37 °C, 100  $\mu\text{L}$  of the tung oil-in-water emulsion (0.1 M) were added into each well. The plate was shaken for 60 s (2 mm amplitude). Then, 50  $\mu\text{L}$  of the AAPH solution (4 mM) were added into each well, and the decrease of the tung oil absorbance was measured at 280 nm for 120 min, every 60 s (120 measurements).

The antioxidant value (CAT value) of a molecule was calculated using the same procedure as used for the ORAC assay and was expressed as mol Trolox equivalent/mol of molecule.

#### **Partition coefficient (LogD (pH 7.0)) measurement**

In a 10-mL glass tube, 2 mg of sinapine, sinapic acid or MitoTEMPO were added with a 4 mL 75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer solution (aqueous phase) and 4 mL of octan-1-ol. The mixture was then vortexed for 1 hour, at room temperature, and left to equilibrate for 30 min for sinapic acid and sinapine, and overnight for MitoTEMPO. Both phases were collected with a Pasteur pipette and extemporaneously analyzed by LC-MS, using the procedure described below.



**Suppl Fig. 1. Physical chemical properties of sinapic acid and sinapine. (A-B)** Antioxidant activity of both compounds evaluated *in vitro* by **(A)** the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay and **(B)** the conjugated autoxidizable triene (CAT) assay. **(C)** Logarithm of the measured partition coefficient (LogP) between octan-1-ol and water of sinapine, sinapic acid, and MitoTEMPO, and LogP values found in literature for MitoQ3, MitoQ5, and MitoQ10 [3]. \* $p < 0.05$

## References

- [1] B. Ou, T. Chang, D. Huang, R.L. Prior, Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First Action 2012.23, *J. AOAC Int.* 96 (2013) 1372–1376. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>.
- [2] M. Laguerre, L.J. López-Giraldo, J. Lecomte, B. Baréa, E. Cambon, P.F. Tchobo, N. Barouh, P. Villeneuve, Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe, *Anal. Biochem.* 380 (2008) 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.06.006>.
- [3] A.M. James, H.M. Cochemé, R.A.J. Smith, M.P. Murphy, Interactions of Mitochondria-targeted and Untargeted Ubiquinones with the Mitochondrial Respiratory Chain and Reactive Oxygen Species IMPLICATIONS FOR THE USE OF EXOGENOUS UBIQUINONES AS THERAPIES AND EXPERIMENTAL TOOLS, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21295–21312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501527200>.



## ETUDE n°2

# TRANSLOCATION DE LA ENOS VERS LES MITOCHONDRIES SUBSARCOLEMMALES : LA S-NITROSYLATION UN ACTEUR CLE DE LA CARDIOPROTECTION PAR L'EXERCICE

Increased protein S-nitrosation in subsarcolemmal mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection.

[Doria Boulghobra](#)<sup>1</sup>, Mathilde Dubois<sup>1</sup>, Florence Coste<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>3</sup>, Béatrice Alpha-Bazin<sup>2</sup>, Jean-Charles Gaillard<sup>2</sup>, Jean Armengaud<sup>2</sup>, Charlotte Farah<sup>4</sup>, Cyril Reboul<sup>1\*</sup>

## II. Etude n°2

### 1. Contexte scientifique

Des travaux récents (Calvert John W. et al., 2011; Farah et al., 2013) ont démontré que l'activation de la eNOS par l'exercice physique joue un rôle clé dans la moindre sensibilité du cœur à l'IR. Par ailleurs, la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial semble être capable, dans de nombreuses stratégies de cardioprotection, de limiter la production d'ERO et l'activation du mPTP. Cependant, à ce jour, l'impact de l'exercice sur la signalisation eNOS/NO au niveau mitochondrial demeure méconnu.

L'hypothèse de ce travail était donc que l'exercice physique est à l'origine d'un ciblage de la mitochondrie par la voie eNOS/NO/SNO permettant d'expliquer au moins en partie la cardioprotection induite par l'exercice.

### 2. Objectifs

Ainsi l'objectif de cette deuxième étude de thèse a été d'évaluer comment la voie eNOS/NO/SNO est capable d'intégrer avec la mitochondrie pour aboutir à une protection des mitochondries au cours de l'IR.

### 3. Résumé

#### 3.1. Méthodologie et résultats majeurs

Pour répondre aux objectifs, des rats Wistars ont été répartis aléatoirement en deux groupes expérimentaux : un premier groupe sédentaire (Sed) et un second groupe soumis à un entraînement de 5 semaines à 60% de la VMA (5 jours par semaine) (Ex-Tr). Les différentes fractions subcellulaires cardiaques (cytosolique et mitochondriale) ont été obtenues par centrifugations différentielles. Les protéines VDAC1, Cx43 et GAPDH ont été utilisées comme marqueurs spécifiques de chacune des fractions. Nous avons pu observer qu'un entraînement modéré de 5 semaines est à l'origine d'une

translocation de la eNOS au niveau de la fraction enrichie en SSM. Afin d'évaluer si ce phénomène était associé à une augmentation de la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial, des cardiomyocytes de rats Sed et Ex-Tr ont été pré-incubés avec une sonde fluorescente sensible au NO (DAF2) et en présence de Mitotracker afin de marquer les mitochondries. Suite à un stress à l' $H_2O_2$ , les cardiomyocytes et mitochondries cardiaques de rats Ex-Tr produisent plus de NO que les Sed. Une analyse du S-nitrosoprotéome, nous a permis d'évaluer l'impact de l'entraînement sur la S-nitrosylation des protéines mitochondriales. De cette manière, on confirme que l'exercice physique est capable d'augmenter la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial et que ceci est associé à une augmentation de la S-nitrosylation de protéines de la réponse mitochondriale à un stress. Il est par ailleurs intéressant de noter que l'entraînement permet également de protéger les mitochondries d'un stress calcique en limitant le seuil d'activation du mPTP. Cet effet protecteur est aboli en présence d'ascorbate, un agent réducteur connu pour dénitrasyler, suggérant que la S-nitrosylation joue un rôle important dans ce phénomène. Le pré-traitement des cardiomyocytes de rats Sed et Ex-Tr avec de l'ascorbate ou de la L-NAME (un inhibiteur des NOS) augmente la production d'EROmt chez les Ex-Tr sans impact majeur chez les Sed. Enfin, on confirme ces résultats sur cœur isolé perfusé ou non avec de la L-NAME. En effet, on démontre par coloration à la DHE, que l'exercice physique est à l'origine d'une réduction de la production d'ERO au cours de la reperfusion post-ischémique. De manière intéressante, l'utilisation de L-NAME n'a aucun effet sur la production d'ERO d'animaux Sed, mais conduit à une augmentation marquée de la production d'ERO chez les entraînés, soulignant encore une fois, le rôle clé du NO dans les effets bénéfiques de l'exercice sur la production d'ERO au cours de l'IR.

### 3.2. Conclusion

Dans l'ensemble, ces travaux ont permis de montrer que l'exercice physique est à l'origine d'une translocation de la eNOS vers les SSM, permettant ainsi d'augmenter la biodisponibilité du NO et la S-nitrosylation de protéines impliquées dans la vulnérabilité des mitochondries au cours de l'IR, permettant ainsi de limiter leur sensibilité.

## 4. Article

### Increased protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection.

Doria Boulghobra<sup>1</sup>, Mathilde Dubois<sup>1</sup>, Béatrice Alpha-Bazin<sup>2</sup>, Florence Coste<sup>1</sup>, Sandrine Gayard<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>3</sup>, Gregory Meyer<sup>1</sup>, Jean-Charles Gaillard<sup>2</sup>, Jean Armengaud<sup>2</sup>, Charlotte Farah<sup>4</sup>, Cyril Reboul<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> LAPEC EA-4278, Avignon Université, F-84000 Avignon, France.

<sup>2</sup> UMR 0496 CEA-INRAE, CEA/DRF/Joliot/DMTS/SPI-Li2D

<sup>3</sup> UR407 INRA Pathologie Végétale, INRAE, 84140, Montfavet, France.

<sup>4</sup> IREC, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique.

Words count: 7968

Short title: mitochondrial S-nitrosylation and exercise-induced cardioprotection

#### CORRESPONDING AUTHOR

**Dr Cyril Reboul**

Cardiovascular Physiology Laboratory – EA4278

Faculty of Sciences, Avignon Université

74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Phone: +33 490162946

E-mail: [cyril.reboul@univ-avignon.fr](mailto:cyril.reboul@univ-avignon.fr)

## ABSTRACT

**Background:** The activation of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the heart play a key role in exercise-induced cardioprotection during ischemia-reperfusion (IR). Recently, increased nitric oxide (NO) bioavailability at the level of mitochondria has been reported as an efficient strategy to limit ischemia-reperfusion injuries. However, whether exercise increases NO bioavailability at the level of mitochondria to protect the heart during IR has never been studied. We hypothesized here that the cardioprotective effect of exercise training could be explained by a translocation of eNOS/NO cardioprotective signaling to mitochondria.

**Methods:** Wistar rats were assigned to sedentary (Sed) or exercised (Ex-Tr, 5 days/week for 5 weeks) groups. The impact of exercise training on eNOS, NO production and protein S-nitrosylation (PSNO) at the level of mitochondria was evaluated using western blot, confocal microscopy and s-nitrosoproteomic. Mitochondrial calcium retention capacity was evaluated on isolated mitochondria. ROS production was measured 10 min after IR with Dihydroethidium. Finally, Mitosox Red was used to detect mitochondrial ROS production on isolated cardiomyocytes.

**Results:** We reported that exercise training increased the level and the phosphorylation of eNOS at the level of subsarcolemmal mitochondria (SSM). We confirmed using confocal microscopy that NO production is increased in response to stress in cardiomyocytes of exercised hearts. In addition, using an S-nitrosoproteomic approach we further observed that exercise increased the bioavailability of NO in SSM and increased the S-nitrosylation of key proteins involved in mitochondrial function. In line with these results, we reported that isolated mitochondria from Ex-Tr rat hearts have a higher capacity to store  $Ca^{2+}$  than sedentary ones. Interestingly, this was abolished by L-NAME or by the reducing agent ascorbate, known to denitrosylated proteins. Pre-treatment with Ascorbate or with L-NAME, to inhibit NOS activity, increased mitochondrial ROS production in cardiomyocytes of Ex-Tr hearts, with no major impact in Sed ones. Finally, we reported the same phenomenon on isolated hearts pre-treated or not with L-NAME before and during IR.

**Conclusion:** Altogether, these results strongly support the hypothesis that exercise training increased the ability of eNOS to target SSM, which contributes to the S-nitrosylation of key proteins involved in cardioprotection.

**KEYWORDS:** Nitric oxide; S-nitrosylation, ischemia-reperfusion, mPTP,

## 1. INTRODUCTION

Cardiovascular ischemic heart disease remains one of the main cause of morbidity and mortality worldwide (Roth et al., 2017). Many cardioprotective strategies, including pre-, post- and pharmacological conditioning (IPC and PostC respectively) are effective to protect the heart during ischemia-reperfusion in animal models. However, they remain poorly applicable or effective in humans. Among cardioprotective strategies, exercise training is able to protect both rodent (Farah et al., 2013; Kleindienst et al., 2016) and human (Ejlertsen et al., 2017b; Marongiu and Crisafulli, 2014) hearts during ischemia-reperfusion (IR). However, the underlying mechanisms remain unclear. Recently, we (Farah et al., 2013) and others [6] have reported that the activation of eNOS-NO pathway by exercise training strongly contributed to protect the heart. Indeed, the cardioprotection is lost in condition of pharmacological inhibition (Farah et al., 2013) or genetic deletion of eNOS [6]. Initially much of the cardioprotection afforded by NO was attributed to activation of guanylyl cyclase resulting in the production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and the activation of protein kinase G (PKG) (Costa et al., 2008; Costa Alexandre D.T. et al., 2005). In the last decade, protein S-nitrosylation (PSNO), defined as the binding of one NO moiety to a thiol group of a cysteine residue (Penna et al., 2014) has emerged as an important modulator of cardiovascular functions (Lima et al., 2010; Schulman and Hare, 2012) and was proposed as a key mechanism in NO-mediated cardioprotection (Kohr et al., 2012, 2011a; Sun et al., 2007b).

Mitochondria are well described as key triggers of post-ischemic reperfusion injuries. Indeed, post-ischemic reperfusion leads to mitochondrial-driven injuries explained by excessive production of reactive oxygen species (ROS) and dysregulation of calcium handling. Both leads to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening that results in abnormal permeation, swelling and disruption of mitochondrial membranes and subsequent release of pro-apoptotic factors (Lemasters et al., 2009). Thus, over the last decade, mitochondria has emerged as a key target of cardioprotective strategies (i.e IPC and PostC) (Murphy and Steenbergen, 2007; Penna et al., 2013). Interestingly, NO is a strong regulator of mitochondrial function (Erusalimsky and Moncada, 2007) and eNOS-NO pathway play a key role in several cardioprotective pathways (Burwell and Brookes, 2007). Recently, it has been reported that in the heart the mitochondrial PSNO account for 56% of total PSNO and that 36% of SNO proteome requires eNOS-derived nitric oxide (Doulias et al., 2013). Interestingly, in line with this, in

response to IPC most of PSNO are mitochondrial proteins (52% of the SNO protein) (Murphy et al., 2012). This phenomenon seems to be explained by eNOS translocation to subsarcolemmal mitochondrial (SSM) in response to IPC (Sun et al., 2015a). In line with this, heart incubation with a mitochondrial-specific NO donor (mitoSNO) has been reported to protect the heart during IR (Chouchani et al., 2013). The cardioprotection by mitoSNO appeared to be dependent of PSNO and independent of GMPc-PKG activation (Methner et al., 2013), since cardiomyocytes ablation of PKG has no impact. Thus, eNOS-mitochondria interactions and PSNO appeared as a key elements to explain NO-dependent cardioprotection.

Despite the effect of physical exercise on mitochondria appears evident in both healthy and pathological heart, its role in exercise-induced cardiac pre-conditioning during ischemia-reperfusion remains not clear and the underlying mechanisms poorly understanding (Boulghobra et al., 2020a). Therefore, we tested here the hypothesis that cardioprotective effect of exercise pre-conditioning could be explain by a translocation of eNOS to mitochondria with subsequent increases of NO bioavailability and PSNO. We found by western blot, confocal microscopy and SNO proteomic approach that exercise **i)** is able to increase eNOS/NO bioavailability at the level of SSM, and therefore **ii)** modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mitochondrial permeability transition (mPT) and ROS production during IR.

## 2. RESULTS

### 2.1. Exercise training increased eNOS level and activation in Subsarcolemmal Mitochondrial subfraction.

Exercise training is well known to activate eNOS in the heart, which has been reported as a key trigger of exercise-induced cardioprotection (Calvert John W. et al., 2011; Farah et al., 2013). Recently, cardiac ischemic pre-conditioning has been shown to induce eNOS translocation from cytosol to SSM (Sun et al., 2015a). Thus we first evaluated whether exercise training was able to activate the same process. For this, as shown in *Figure 1A*, using sedentary (Sed) and exercise trained (Ex-Tr) hearts, we used differential centrifugation to obtain cytosolic and SSM subfraction. Anti-VDAC1 and anti-Cx43 immunoblot were used as markers of SSM and anti-GAPDH as a marker of cytosolic fraction (*Figure 1B*). Using those different fractions, we evaluated the impact of exercise training on eNOS level. In line with results obtained on total heart homogenates (Calvert John W. et al., 2011; Farah et al., 2013), exercise training has no impact on the level of eNOS in the cytosol (*Figure 1D, left panel*). However, we reported that the level of eNOS in SSM was markedly increased in response to exercise training when compared to Sed (*Figure 1D, right panel*). We also evaluated the impact of a single bout of exercise (35min) and we observed similar results, that is a marked increasing eNOS level in SSM (SSM eNOS normalized to cytosolic eNOS; *Suppl Figure 1C*), suggesting that eNOS translocate from the cytosol to the SSM in response to exercise. Considering that in cardiomyocytes two populations of mitochondria (SSM and Intermyo-fibrillar: IFM) exist, we next evaluated whether exercise training is also able to impact the level of eNOS in the IFM subfraction. Using, differential centrifugation coupled with myofilaments enzymatic digestion with nargase, we performed western blot of eNOS on IFM subfraction (*Suppl Figure 1A and 1B*). The enzyme eNOS was not detectable in IFM (*Suppl Figure 1D*). If we performed western blot on fraction containing both IFM and myofilaments (obtained without the use of nargase digestion), we detected an increase of eNOS in response to exercise training (*Suppl Figure 1E*). This reinforce the idea that in response to exercise eNOS is able to translocate from cytosol to specific microdomains. Considering that SSM are known to be more susceptible to IR damage compared to IFM (Palmer et al., 1986; Riva et al., 2005) and that results obtained on eNOS-SSM interactions were more conclusive, we next focused our work on SSM. The eNOS is well known to be activated by phosphorylation on its residue serine1177 (eNOS-P<sup>Ser1177</sup>). Exercise training has no impact on the level of eNOS-P<sup>Ser1177</sup> in the cytosol (*Figure 1E and F left panel*). Interestingly, a significant

increase of eNOS-p<sup>Ser1177</sup> was reported in response to exercise training in SSM when compared to sedentary SSM (*Figure 1E and F right panel*). In the cardiac tissue, another isoform of NOS, the nNOS, is also expressed. We (Farah et al., 2013) and others [6] have previously reported that exercise training has no impact on nNOS levels. This is confirmed in the present work in the cytosol (*Figure 1G and H left panel*) and we did not detect nNOS in SSM (*Figure 1G and H right panel*). Altogether, these results indicate that eNOS-SSM interaction was increased in response to exercise training.

## 2.2. Exercise training increased NO production in response to oxidative stress.

Considering the impact of exercise training on eNOS activation and its ability to increase its level in SSM, we next evaluated whether Ex-Tr is able to improve NO production in response to a stress situation mimicking IR. For this, intracellular NO was measured on adult primary isolated cardiomyocytes using the NO-sensitive dye DAF2 (5  $\mu$ M) and stressed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M). Loaded cardiomyocytes with DAF2 were distributed into a 96 well microplate and the fluorescence was determined every 10 sec for 25 min (*Figure 2A*). Some cells were pre-incubated with the NO synthase inhibitor (L-NAME; 100  $\mu$ M) 30 min prior measurements to evaluate the contribution of NOS-dependent NO production. The production of NO was measured under basal conditions and following a treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to promote eNOS-dependent NO production in cardiomyocytes (Sartoretto et al., 2011) and mimic IR-induced oxidative stress. Under control conditions, the fluorescence of cells was unchanged over the time (*Figure 2A*). By contrast, the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> results in a progressive and marked increases in DAF2 fluorescence in Ex-Tr cardiomyocytes and to a lesser extent in Sed ones (*Figure 2A*). When cells were pre-treated with L-NAME, this increase was blunted to the same extent in both Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (*Figure 2A and Suppl Figure 2A*). To evaluate whether NO production in cardiomyocytes could be localized at the level of mitochondria, confocal microscopy was performed using both DAF2 to evaluate NO production and a MitoTracker probe to specifically localize the mitochondria. The same conditions were next applied. As shown in *Figure 2B and 2C*, results obtained with confocal microscopy were in line with those obtained with the microplate reader. No difference was observed under basal conditions between groups, whereas in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO-dependent DAF2 fluorescence tended to be increased in Sed cells (+127%; p=0.18) and was markedly improved in Ex-Tr cells (+282%; p<0.05) (*Figure 2B and C*). In these conditions, DAF2 fluorescence was higher in Ex-Tr compared to Sed cardiomyocytes (*Figure 2B and C*). L-NAME reduced DAF2 fluorescence in both Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (*Suppl Figure 2B and 2C*). In cardiomyocytes, NO-dependent DAF2 fluorescence has been previously reported to colocalize with mitochondria (Dedkova and Blatter,

2009b). The merge of signals obtained with DAF2 and MitoTracker showed a good colocalization of signals both in Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (*Figure 2B, Suppl Figure 2D and 2E*) with a good Pearson's correlation coefficient ( $r^2 = 0.85$  for Sed;  $r^2 = 0.89$  for Ex-Tr). Considering this, based on the specific staining of mitochondria with the MitoTracker, we next quantified the level of DAF2 fluorescence specifically at the level of mitochondria. We reported that in response to  $H_2O_2$ , NO production was higher in Ex-Tr mitochondria compared to sedentary ones (*Figure 2D*). Altogether, these findings suggest that exercise training increased the ability of cardiomyocytes to increase NO bioavailability at the level of mitochondria.

### 2.3. Exercise training modified the pattern of SSM protein S-nitrosylation.

Based on the previous results and the fact that eNOS-NO-dependent cardioprotection has been mostly attributed during the last year to PSNO (Sun and Murphy, 2010), we next used the iodo-TMT switch assay followed by enrichment of TMT-labeled peptides by anti-TMT resin and shotgun proteomics carried out by nanoLC-MS/MS to evaluate the impact of exercise training on PSNO. This proteomic approach was performed both on total LV homogenates and SSM from Sed and Ex-Tr hearts (*Figure 3 A*). Using this redox-proteomic approach, we identified in total LV homogenates, 296 proteins with at least one TMT labeled modification and 345 proteins in the enriched SSM subfractions. We can note that in SSM, among the 345 proteins, 125 are mitochondrial proteins. Next, we compared how the extent of S-nitrosylation of individual proteins was modified under our different conditions. Volcano plots were created to assess changes in S-nitrosylation of individual proteins in response to exercise training relative to sedentary condition. No major effect of exercise training were observed in the symmetrical plots for total LV homogenates (*Figure 3B*). On the other hand, there was a clear bias towards proteins being significantly S-nitrosylated by exercise training in SSM subfractions (*Figure 3 C*). This appeared to be particularly true regarding mitochondrial proteins (red dot) (*Figure 3 C*). No clear separation between groups and cellular subfractions was observed using unsupervised partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Thus, we next used a supervised PLS-DA (sPLS-DA) to find out the separation between our conditions and simultaneously identify the proteins whose expression can contribute to separate the groups. All proteins, 345 proteins from 12 different samples (3 samples in each conditions) were used and scores plot were generated. Using this approach we observed that total LV homogenates and SSM fractions were separated completely along component 1 (*Suppl Figure 3*). Both Sed and Ex-Tr as well as total homogenates and SSM were well separated along component 2 (*Suppl Figure 3*). Finally, as shown in *Figure 3D*, SSM fractions from Sed and Ex-Tr hearts were well

separated along component 3. Regarding this last result, 20 proteins, including 11 mitochondrial proteins or proteins that can directly interact with mitochondria were identified, and contribute to explain the separation of SSM subfractions between Sed and Ex-Tr hearts along component 3 (*Figure 3E*). We next used another approach based on differentially abundant proteins in SSM in response to Ex-Tr, with an optimized cutoff employed (fold change >1.5, p-value <0.05). We identified 5 mitochondrial proteins including 2 proteins already identified with the first method (Cx43 and CHCHD2). Finally, considering its biological importance during IR and its trend to be more abundant in Ex-Tr group (fold change: 2.33; p=0.0572), we also added CypD (PPIf) in the list of those proteins of interest. The spectral count of each samples for mainly impacted proteins were represented in the *Figure 3F*. We reported that proteins involved in the regulation of the ETC, such as NDUFA10, ETFDH, CHCHD2 and Cx43, in mitochondrial  $\beta$ -oxidation (ACADL), in the TCA cycle (MDH2), in calcium homeostasis (RyR2 and Cx43) or finally in the regulation of mPTP activation (CypD) appeared to explain differences in SNO proteome between Sed and Ex-Tr hearts.

#### **2.4. Exercise training prevented $\text{Ca}^{2+}$ induced mPTP opening: a major role for S-nitrosylation.**

Considering that exercise training impact the S-nitrosylation of key proteins involved in ETC and in cardioprotective signalling pathways, we next investigated whether this strategy is able to impact mPTP activation in response to mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload. For this, we used a mitochondrial calcium retention capacity (CRC) test on isolated mitochondria. We first confirmed that our test was well designed to evaluate the activation of mPTP by showing that the use of Cyclosporine A (CsA), known as an inhibitor of mPTP activation, prevented the progressive increase in  $\text{Ca}^{2+}$  green 5N fluorescence in response to cumulative  $\text{Ca}^{2+}$  pulses compared to control conditions (*Figure 4A*). As previously published (Magalhães et al., 2014; Marcil et al., 2006), we reported that isolated mitochondria from Ex-Tr rat hearts presented a higher capacity to store  $\text{Ca}^{2+}$  than sedentary ones (*Figure 4A*). This is obvious both in SSM (*Figure 4A*) and IFM (*Suppl Figure 4A-4C*). Next, to evaluate the role of S-nitrosylation on mitochondrial CRC, mitochondria were pre-treated with ascorbate (Asc, 1mM), known as a reducing agent reported to decompose S-nitrosylation (Sun et al., 2015a)(Jaffrey and Snyder, 2001). Interestingly, we reported that ascorbate has only moderate impact on the CRC measured in SSM of Sed hearts; whereas it strongly reduce the CRC in SSM of Ex-Tr hearts (*Figure 4B and 4C*). Thus, differences between Sed and Ex-Tr SSM regarding CRC (*Figure 4A*) were abolished following the pre-treatment with Asc (*Figure 4B and 4C*). These results were confirmed when we performed the CRC test on SSM isolated form hearts perfused or not with L-NAME (100 $\mu$ M), an inhibitor of NOS, for 25 minutes

(Suppl Figure 4A, 4B and 4C), confirming then the role of NO on CRC in Ex-Tr SSM. When we performed CRC tests on IFM, we also reported that Asc blunted difference between Sed and Ex-Tr, but this was less obvious than in SSM (Suppl Figure 5B and 5C). This suggests that other mechanisms than S-nitrosylation were involved to delay mPTP activation in IFM. To further confirm the role of S-nitrosylation, we evaluated the opening of the mPTP by another method based on the rapid inflow of solutes within mitochondria and subsequent swelling. This can be readily monitored by the measurement of the rapid fall in absorbance in response to a single high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu\text{M}$ ). Consistent with our previous results, we reported that the rate of mitochondrial swelling was lower in SSM of Ex-Tr hearts (Figure 4D) compared to Sed ones. The pre-treatment with ascorbate increased the rate of mitochondrial swelling both in Sed and Ex-Tr SSM and abolished the difference between groups (Figure 4D). Finally, to further confirm the impact of NO on SSM CRC, we performed CRC test on SSM treated or not with the NO donor GSNO (500  $\mu\text{M}$ ). Interestingly, treatment with GSNO increased SSM CRC (Figure 4E and F). Altogether, these results further confirm that exercise training has beneficial impact on mitochondrial response to increased  $\text{Ca}^{2+}$  load as observed during IR, and highlight the key role of S-nitrosylation in this phenomenon.

### 2.5. Exercise training reduced mitochondrial ROS production: a major role for S-nitrosylation.

The activation of mPTP during IR depends on a complex interplay between  $\text{Ca}^{2+}$  overload and mtROS production (Görlach et al., 2015). According to previous study, S-nitrosylation of mitochondrial proteins contribute to limit mtROS production during IR (Chouchani et al., 2013). Thus, we next evaluated whether Ex-Tr is able to modulate mtROS production and how S-nitrosylation participate to this phenomenon. For this, Mitosox Red (5  $\mu\text{M}$ ), a sensitive mitochondrial ROS sensitive probe (Andersson et al., 2011) was used. The myocytes loaded with MitosoxRed were distributed into a 96-well microplate. The fluorescence was determined every 20 sec during 15 min (Figure 5A and 5B). To evaluate the implication of the eNOS/NO/SNO pathway in mtROS production, some cells were incubated with Asc or L-NAME 30 min prior measurements. Cells were then stimulated with a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, antimycin A (AA; 10  $\mu\text{M}$ ) to force mitochondria into mtROS production (Figure 5A) (Boulghobra et al., 2020b). For Sed and Ex-Tr cardiomyocytes, stressed with AA, the fluorescence increased continuously during 15 min (Figure 5A). In those conditions, mtROS tended to be higher in Ex-Tr cardiomyocytes compared to Sed ones, without reaching statistical significance (Figure 5A and 5B). Interestingly, we reported that despite Asc or L-NAME pre-incubation have no major effect on mtROS in Sed cells, both resulted in a marked

increase in mtROS in Ex-Tr cardiomyocytes (*Figure 5 A and 5B*). These results strongly suggest that increased NO bioavailability in response to Ex-Tr at the level of cardiomyocytes contributes to modulate mtROS production during a stress situation. Next we used a more integrative approach, using global ischemia-reperfusion on isolated perfused isolated hearts to evaluate the impact of chronic exercise on ROS production (*Figure 5C*). Considering that mitochondrial oxidative stress is a key trigger of cardiac injuries and dysfunction (Cadenas, 2018), we measured using DHE staining, the ROS production during early reperfusion in sedentary and exercised hearts. In line with previous studies (Farah et al., 2013), we reported lower post-IR ROS production in Ex-Tr hearts compared to Sed ones (*Figure 5D*). Interestingly, when the hearts were perfused with the specific mtROS scavenger, mitoTEMPO (MitoT, 0.1  $\mu\text{M}$ ) at concentration previously used to limit cardiac mtROS production (Boulghobra et al., 2020b; Olgar et al., 2018), DHE fluorescence was reduced in sedentary hearts, by 23% (*Suppl Figure 6*), indicating lower ROS accumulation during post-ischemic reperfusion. By contrast no major effects of mitoT were reported in Ex-Tr hearts (*Suppl Figure 6*). These results suggest that the contribution of mitochondrial ROS was less marked in the Ex-Tr hearts compared to Sed ones. Finally, we evaluated the role of eNOS/NO/SNO in ROS production during early reperfusion. For this, we perfused sedentary and exercised hearts with L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) 20 min before ischemia and during early reperfusion (10 min). We previously reported that L-NAME treatment results in a loss of exercise-induced cardioprotection in rats (Farah et al., 2013). In the present study, we first confirmed, using iodo-TMT switch assay (*Suppl Figure 7A*) and western blot analyses, that as previously described (Leite et al., 2010), L-NAME treatment resulted in lower level of protein SNO (*Suppl Figure 7B and 7C*). Using these conditions, we next measured ROS production by DHE staining. We reported that despite L-NAME treatment has no impact on cardiac ROS production during early reperfusion in Sed hearts (14%), it markedly increased (+50%) this parameter in the Ex-Tr hearts (*Figure 5D*), indicating that NO is essential to blunt ROS production during post-ischemic reperfusion.

Given the protective role of protein SNO during early reperfusion, we next evaluated whether the use of a specific and potent GSNOR inhibitor, N6022 (10  $\mu\text{M}$ ), known to increase the level of protein SNO (Casin et al., 2018) was able to limit ROS production during early reperfusion (*Figure 5E*). In line with results obtained following exercise training in rats, N6022 significantly reduced cardiac DHE fluorescence following 10 min of post-ischemic reperfusion (*Figure 5F*), indicating lower post-ischemic ROS production. Altogether, those results indicate that protein S-nitrosylation plays a key role to limit excessive mtROS production during early reperfusion in the exercised hearts.

### 3. DISCUSSION

In this study, our results clearly support the hypothesis that the eNOS/NO/SNO signaling plays a key role in the ability of exercise to protect mitochondria during IR. Indeed, we reported for the first time that exercise training **i)** increases NO bioavailability at the level of mitochondria, **ii)** results, at the level of SSM, in SNO of key proteins involved in mitochondrial response to stress, to finally **iii)** modulates Ca<sup>2+</sup>-dependent mPT and ROS production in conditions mimicking IR. Collectively these results provide additional insights to better understand the role of eNOS in exercise-induced cardioprotection.

There is now considerable evidences that eNOS/NO signaling plays a central role in exercise-induced cardioprotection during IR (Calvert John W. et al., 2011; Farah et al., 2013). This eNOS-dependent cardioprotection is mediated through the increase of NO metabolites storage (i.e, nitrite and s-nitrosothiols) before ischemia and higher protein or S-nitrosylation during early reperfusion (Farah et al., 2013). The underlying mechanisms and the identification of specific sites of S-nitrosylation remain however limited. We reported here that SSM constitute a privileged target of NO-dependent cardioprotective signaling in response to exercise training. This phenomenon is also observed at the level of IFM but to a lesser extent. Mitochondria are well known as end effectors of cell death, and many cardioprotective signaling mechanisms have been found to converge to mitochondria (Murphy and Steenbergen, 2007). In line with our work, in response to IPC, eNOS is able to translocate from the cytosol to SSM and to increase the level of protein SNO (Sun et al., 2015a). Nevertheless, the underlying mechanisms associated with this phenomenon remain to be elucidated. The interactions between caveolae, caveolin-3 and eNOS could play a key role. Indeed, in a model of cardiac IPC, the disruption of caveolae with a cholesterol sequestering agent (Sun et al., 2012) or the use of caveolin-3<sup>-/-</sup> mice (Sun et al., 2015a) abolished the translocation of eNOS to SSM and the subsequent increase in protein SNO. Interestingly, both caveolae and caveolin-3 are considered as stretch sensitive elements of cardiomyocytes. Considering that exercise increases mechanical workload and results in myocardial stretch, this stimulus could constitute a key trigger of eNOS translocation to mitochondria. Nevertheless further studies will be necessary to better understand this phenomenon. Adrenergic stress could constitute another trigger of eNOS activation and translocation. Indeed, in  $\beta$ 3-Adrenergic<sup>-/-</sup> mice, exercise training is not able to activate eNOS and the cardioprotection is lost [6].

When translocates at the level of mitochondria, eNOS is certainly not able to enter within the mitochondria, since this enzyme does not possess the transport sequence requires for its passage through the inner mitochondrial membrane (Lacza et al., 2009). However, eNOS has been reported to be able to dock on the outer mitochondrial membrane, where it constitutes a source NO able to regulate mitochondrial respiration (Gao et al., 2004).

In our work both SSM and IFM are protected by exercise training and are sensitive to denitrosylation with ascorbate, showing the key role on the eNOS/NO/SNO signaling. Nevertheless, in line with previous work (Sun et al., 2015a), the role of S-nitrosylation appear to be more obvious in SSM compared to IFM. This result is of interest. Indeed, despite SSM represent around 10% of the total cardiac mitochondria, they are more vulnerable to IR and reported to be in the frontline of IR injuries (Palmer et al., 1986; Sun et al., 2015a). Specifically, SSM are suspected to be more sensitive to calcium overload and alterations of oxidative phosphorylation than IFM (McMillin-Wood et al., 1980; Riva et al., 2005). In addition, SSM from hearts submitted to IR exhibited alterations of their enzymatic antioxidant system, while IFM were not affected (García-Niño et al., 2017b; Kuznetsov and Margreiter, 2009b). An interesting point that could contribute to explain that eNOS/NO/SNO play a key role on SSM, and to a lesser extent on IFM, is that the junction protein Cx43 is only present in SSM. Apart from being present at the sarcolemma, Cx43 has been identified in mitochondria of cardiomyocytes and is mainly located in the inner mitochondrial membrane of SSM. Mitochondrial Cx43 has been reported to impact respiratory function and electron transfer chain (Boengler et al., 2012). In addition, IR is associated with increased oxidized Cx43 cysteines, which is attenuated by IPC (Ruiz-Meana et al., 2014). Interestingly, increased S-nitrosylation of mitochondrial Cx43 by IPC has been proposed to explain the link between NO and Cx43 in the signal transduction cascade of cardio-protective interventions (Soetkamp et al., 2014). Indeed, the calcium retention capacity of SSM was lowered by blocking Cx43 with the specific inhibitor Gap27 (Srisakuldee et al., 2014). This in line with our results showing that in response to exercise training, increased CRC of SSM is associated with increased level of Cx43 S-nitrosylation. Nevertheless, we do not believe that solely the S-nitrosylation of Cx43 is enough to explain the cardioprotection afforded by such a pleiotropic strategy. Indeed, in line with previous work using IPC or NO donor to protect the myocardium during IR (Chouchani et al., 2013, 2017; Sun et al., 2015a), we reported that several key proteins involved in cardiac injuries during IR are S-nitrosylated in response to exercise training. Among biological process sensitive to NO level during reperfusion, excessive production of ROS by mitochondrial ETC has been reported to be attenuated by IPC or NO donor (Chouchani et al., 2013). Interestingly, S-nitrosylation of the ND3 (NADH

deshydrogenase 3) subunit of mitochondrial complex I, considered as the key trigger of ROS overproduction during IR, has been proposed to explain the cardioprotection afforded by mitoSNO, a mitochondrial targeting NO donor (Chouchani et al., 2013). In our work we did not report that ND3 subunit was S-nitrosylated in response to exercise training, but we observed that several proteins of the ETC, including NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1  $\alpha$  subcomplex subunit 10 (NDUFA10), a complex I subunit, electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (ETFDH), and Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2 (CHCHD2), known to connect metabolism to apoptosis (Liu and Zhang, 2015), were S-nitrosylated. Consistent with this, pre-treatment with ascorbate or with L-NAME increased mitochondrial ROS production in cardiomyocyte of Ex-Tr hearts, whereas this was not the case in sedentary ones. We reported the same phenomenon during early reperfusion on isolated hearts pre-treated with L-NAME before IR, confirming that S-nitrosylation of key proteins of the ETC can contribute to limit ROS overproduction during IR. Among other proteins that could explain the cardioprotection afforded by exercise training, we also reported the S-nitrosylation of CypD. This protein is largely described as a key regulator of mPTP and presented to be highly redox-sensitive. Indeed, during ischemia, the rise in mitochondrial calcium leads to de-acylation of CypD, its oxidation and the subsequent activation of mPTP (Amanakis et al.; Nguyen et al., 2011). It has been proposed that S-nitrosylation of CypD contributes to cardioprotection by shielding Cysteine 202 (C202) of CypD from oxidation (Amanakis et al.; Kohr et al., 2011b; Nguyen et al., 2011). This is consistent with our results. Indeed, we reported that exercise training increased CypD S-nitrosylation on the same Cysteine residue, which is associated with delay activation of mPTP in response to  $Ca^{2+}$ .

Some limitations should be considered in this study. Since SNO signalling is a very labile post-translational protein modification, we did not purify the mitochondria using Percoll gradient ultracentrifugation, since it has been reported that mitochondrial proteins are susceptible to excessive oxidation during preparation (Chang et al., 2014). Therefore, we cannot rule out the possibility that the increased association of eNOS with mitochondria is due to increased cytosolic eNOS and endoplasmic reticulum eNOS contamination in SSM during sample preparation.

Overall, our findings suggest that several key mitochondrial proteins involved in cardiac injuries during IR are S-nitrosylated in response to exercise training. Collectively these results provide additional insights to better understand the role of eNOS in exercise-induced cardioprotection and provides evidence to support the hypothesis that cardioprotection by exercise training is explained by a translocation of the eNOS/NO/SNO cardioprotective signalling to mitochondria. Further studies will be

needed to better understand how each specific targets contributes to limit mitochondrial ROS production and mPTP activation during IR.

## 4. MATERIALS AND METHODS

Detailed information on the methodology is available in Supplemental Information.

### 4.1. Animal model

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive 2010/63/EU (N° CEEA-00223) and approved by the national research ethics committee (n°APAFIS#3487-2016010813443457). Male Wistar rats (12-week-old; weight=225–275g, Janvier, France) were randomly assigned into two groups: Sedentary control group (Sed) and 5-weeks treadmill exercise trained group (Ex-Tr). At the end of the study, the impact of exercise training in the Ex-Tr group was confirmed by the higher maximal aerobic velocity (MAV), measured as previously described (Reboul et al., 2005), in Ex-Tr rats compared to sedentary rats (Sed= 36m/min  $\pm$  1.58 m/min; Ex-Tr: 46,25  $\pm$  1.31 m/min;  $p < 0.05$ ).

### 4.2. Exercise protocol

#### Exercise training

Moderate exercise training was performed as previously described (Farah et al., 2013). Briefly, rats were exercised on a motor-driven treadmill (Ugo Basile, Transforming ideas into instruments, 47300) 45 min/day, 5 days/week for 5 weeks at 25m/min ( $\approx$ 60% of their MAV). To avoid the acute effects of exercise, rats were sacrificed 24h after the last exercise training session.

### 4.3. Measurement of ROS production following Ischemia-Reperfusion (IR)

#### Ischemia-Reperfusion (IR) on isolated hearts

Ischemia-reperfusion on isolated hearts were performed as previously described (Farah et al., 2013). Hearts were perfused or not for 25 min with the NOS inhibitor, L-NAME (L-NAME, Abcam, ab120136, 100  $\mu$ M), or the GSNOR inhibitor (N6022, 10 $\mu$ M, Caymal Chemical) for 25 min.

#### Measurements of ROS production by DHE staining

Cardiac ROS production has been measured as previously described (Boulghobra et al., 2020b).

#### **4.4. Measurement of mtROS and NO production on isolated cardiomyocytes**

Ventricular cardiomyocytes were isolated as previously described (Cazorla et al., 2005).

##### Measurement of mtROS production.

Adult cardiomyocytes (200 000 cell/mL) were incubated 30 min at 37°C with fluorogenic probe sensitive to mitochondrial ROS production, MitoSoxRed dye (5 µM, Ex: 510 nm; Em: 580 nm; Fisher Scientific, Invitrogen, M36008)(Fauconnier et al., 2007) with or without L-NAME (100 µM) or sodium L-ascorbate (1 mM) and distributed into a microplate and immediately transferred into a microplate reader (Synergy HT Microplate Spectrophotometer Biotek). Cells were stimulated with 10 µM of a complex III blocker, Antimycin A (10 µM, AA, Sigma Aldrich) to force the cell to produce mitochondrial ROS.

##### Measurement of NO production.

Direct measurements of NO production were performed as previously described (Dedkova and Blatter, 2009b). Sedentary and exercised cardiomyocytes were loaded with the fluorescent NO-sensitive dye 4,5-diaminofluorescein diacetate (5 µM, DAF2-DA; Ex: 491nm, Em: 513nm, abcam; ab145283) for 15min at 37°C. Loaded cardiomyocyte was distributed into 96 well microplate to evaluate intracellular NO production with a microplate reader (Synergy HT Microplate Spectrophotometer Biotek) or were used to determine NO production and colocalization with mitochondria (Mitotracker Orange CMXRos) by confocal microscopy (SP8 LEICA, microscopy platform INRAE).

#### **4.5. Mitochondrial calcium retention capacity and swelling assays**

Cardiac mitochondria were isolated as previously described (Boulghobra et al., 2020b) (Figure 1A).

### Calcium retention capacity.

Calcium retention capacity was examined as previously described (Amanakis et al.; Pan et al., 2013) by using the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, Calcium Green-5N (1  $\mu\text{M}$ , Invitrogen, C3737) as an extramitochondrial calcium probe. Mitochondria were incubated or not with sodium L-ascorbate (1 mM) to evaluate the impact of s-nitrosylation (Sun et al., 2015a) and with an NO donor: GSNO (500 $\mu\text{M}$ ). Some mitochondria were obtained from isolated heart perfused or not with L-NAME for 25 min. Calcium Green 5N Fluorescence was measured all along the experiments using an excitation/emission wavelength of 507/536 nm, respectively in a microplate reader (Synergy HT Microplate Spectrophotometer Biotek).

### Calcium swelling assay.

Calcium-induced mitochondrial swelling was measured spectrophotometrically as a decrease in absorbance at 540 nm using a microplate reader (Epoch microplate reader, Biotek). Mitochondrial swelling was induced by adding a single doses of  $\text{CaCl}_2$  (250  $\mu\text{M}$ ) on mitochondria pre-treated or not with ascorbate (Asc, 1 mM). The absorbance at 540 nm was recorded continuously for 25 min.

## **4.7. Proteomic and S-nitrosoproteomic**

### Determination of SNO occupancy with cysteine-reactive tandem mass tags

Intact cardiac SSM (1 mg/mL) or total homogenates were isolated as described above. Proteins were extracted in HENS buffer, followed for SSM by 3 freeze/thaw cycles in liquid nitrogen and vigorous vortexing. Undissolved lipid fragments were spun down by centrifugation at 10.000 g for 10 min at 4 °C. SNO occupancy was determined using the cysteine-reactive Tandem Mass Tag (cysTMT) labeling and enrichment kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA); see *Figure 3A and Suppl Figure 7A* for depiction of labeling protocol. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions. Next, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was performed using an Ultimate 3000 nano-LC system coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) operated as described previously (Klein et al., 2016). The Q-Exactive HF mass spectrometer was operated in a data dependent mode with a Top20 strategy, (i.e., one MS1 high resolution [60,000] scan for precursor ions followed by data-dependent MS2 scans on the twenty most abundant

precursor ions with 10 sec dynamic exclusion time of previously selected ions), with a scan range of MS acquisition from 350 to 1800 m/z. Secondary ions were isolated with a window of 2.0 m/z. The raw files generated from the Q-Exactive HF were analyzed using Proteome Discoverer v1.3 software (Thermo Fisher Scientific). Peak lists were generated with the Mascot Daemon software (version 2.6.1 Matrix Science) using the extract\_msn.exe data import filter (Thermo Fisher Scientific) from the Xcalibur FT package (version 2.0.7; Thermo Fisher Scientific). The comparison of protein abundance between treatment groups was performed using the T-Fold test (Carvalho et al., 2012). Finally, the mixOmics package for R (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/mixOmics.html>) was used to conduct

PLS-DA and sPLS-DA analysis (Rohart et al., 2017).

#### 4.8. Western Blot

Immunoblotting was performed using standard techniques as previously described (Meziat et al., 2019).

#### 4.9. Statistical analyses

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. For comparison of experimental conditions, the Student's *t* test, analysis of variance (ANOVA) or repeated measures ANOVA followed by the Bonferonni test was used. A value of  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. Statistical analyses were done with the GraphPad Prism software (8.4.3).

## 5. DECLARATIONS

### 5.1. Funding

This work was supported by a PhD grant to D.B from the SFR Tersys and by a PhD mobility grant to D.B from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire.

### 5.2. Conflicts of interest/Competing interests

The authors have no conflict of interest.

### 5.3. Availability of data and material (data transparency)

Proteomic data were available on PRIDE; raw data will be made available to those requesting it.

### 5.5. Authors' contributions:

Conception, hypothesis definition, and study design, C.R, G.M, G.C, J.A, D.B ; data acquisition, analysis, and interpretation D.B, M.D, S.G, J.C.G., B.A-B, C.R; article writing, D.B, C.R.

## **REFERENCES**

- [1] G. A. Roth et al., « Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 70, no 1, p. 1-25, juill. 2017, doi: 10.1016/j.jacc.2017.04.052.
- [2] C. Farah et al., « Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 108, no 6, p. 389, nov. 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0389-2.
- [3] A. Kleindienst et al., « Exercise does not activate the  $\beta_3$  adrenergic receptor–eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 111, no 4, p. 40, mai 2016, doi: 10.1007/s00395-016-0559-0.
- [4] E. Marongiu et A. Crisafulli, « Cardioprotection Acquired Through Exercise: The Role of Ischemic Preconditioning », *Curr. Cardiol. Rev.*, vol. 10, no 4, p. 336-348, nov. 2014, doi: 10.2174/1573403X10666140404110229.
- [5] H. Ejlersen, Z. J. Andersen, M. C. von Euler-Chelpin, P. P. Johansen, P. Schnohr, et E. Prescott, « Prognostic impact of physical activity prior to myocardial infarction: Case fatality and subsequent risk of heart failure and death », *Eur. J. Prev. Cardiol.*, vol. 24, no 10, p. 1112-1119, juill. 2017, doi: 10.1177/2047487317702046.
- [6] Calvert John W. et al., « 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.*, vol. 108, no 12, p. 1448-1458, juin 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.241117.
- [7] Costa Alexandre D.T. et al., « Protein Kinase G Transmits the Cardioprotective Signal From Cytosol to Mitochondria », *Circ. Res.*, vol. 97, no 4, p. 329-336, août 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000178451.08719.5b.
- [8] A. D. T. Costa, S. V. Pierre, M. V. Cohen, J. M. Downey, et K. D. Garlid, « cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria », *Cardiovasc. Res.*, vol. 77, no 2, p. 344-352, janv. 2008, doi: 10.1093/cvr/cvm050.
- [9] C. Penna, C. Angotti, et P. Pagliaro, « Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning », *Exp. Biol. Med.*, vol. 239, no 6, p. 647-662, juin 2014, doi: 10.1177/1535370214522935.

- [10] B. Lima, M. T. Forrester, D. T. Hess, et J. S. Stamler, « S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling », *Circ. Res.*, vol. 106, no 4, p. 633-646, mars 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207381.
- [11] I. H. Schulman et J. M. Hare, « Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no 6, p. 752-762, juin 2012, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.04.002.
- [12] J. Sun, M. Morgan, R.-F. Shen, C. Steenbergen, et E. Murphy, « Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport », *Circ. Res.*, vol. 101, no 11, p. 1155-1163, nov. 2007, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.155879.
- [13] M. J. Kohr et al., « Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 300, no 4, p. H1327-1335, avr. 2011, doi: 10.1152/ajpheart.00997.2010.
- [14] M. Kohr, A. Aponte, S. J. M. Gucek, C. Steenbergen, et M. E., « Measurement of S-nitrosylation occupancy in the myocardium with cysteine-reactive tandem mass tags: short communication », *Circulation research*, oct. 26, 2012. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22865876/> (consulté le nov. 08, 2020).
- [15] J. Lemasters, T. Theruvath, Z. Zhong, et N. Al, « Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death », *Biochimica et biophysica acta*, nov. 2009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19576166/> (consulté le nov. 08, 2020).
- [16] E. Murphy et C. Steenbergen, « Preconditioning: The Mitochondrial Connection », *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 69, no 1, p. 51-67, févr. 2007, doi: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.163645.
- [17] C. Penna, M.-G. Perrelli, et P. Pagliaro, « Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no 5, p. 556-599, févr. 2013, doi: 10.1089/ars.2011.4459.
- [18] J. D. Erusalimsky et S. Moncada, « Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no 12, p. 2524-2531, déc. 2007, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151167.
- [19] L. S. Burwell et P. S. Brookes, « Mitochondria as a Target for the Cardioprotective Effects of Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 10, no 3, p. 579-600, déc. 2007, doi: 10.1089/ars.2007.1845.

- [20] P.-T. Doulias, M. Tenopoulou, J. L. Greene, K. Raju, et H. Ischiropoulos, « Nitric Oxide Regulates Mitochondrial Fatty Acid Metabolism through Reversible Protein S-Nitrosylation \*\* », *Sci. Signal.*, vol. 6, no 256, p. rs1, janv. 2013, doi: 10.1126/scisignal.2003252.
- [21] E. Murphy, M. Kohr, J. Sun, T. Nguyen, et C. Steenbergen, « S-Nitrosylation: A Radical Way to Protect the Heart », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 52, no 3, p. 568-577, mars 2012, doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.021.
- [22] J. Sun et al., « Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria », *Cardiovasc. Res.*, vol. 106, no 2, p. 227-236, mai 2015, doi: 10.1093/cvr/cvv044.
- [23] E. T. Chouchani et al., « Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I », *Nat. Med.*, vol. 19, no 6, p. 753-759, juin 2013, doi: 10.1038/nm.3212.
- [24] C. Methner et al., « Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 108, no 2, p. 337, févr. 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0337-1.
- [25] D. Boulghobra, F. Coste, B. Geny, et C. Reboul, « Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria? », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 152, p. 395-410, mai 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.005.
- [26] J. W. Palmer, B. Tandler, et C. L. Hoppel, « Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 250, no 5, p. H741-H748, mai 1986, doi: 10.1152/ajpheart.1986.250.5.H741.
- [27] A. Riva, B. Tandler, F. Loffredo, E. Vazquez, et C. Hoppel, « Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 289, no 2, p. H868-H872, août 2005, doi: 10.1152/ajpheart.00866.2004.
- [28] J. L. Sartoretto, H. Kalwa, M. D. Pluth, S. J. Lippard, et T. Michel, « Hydrogen peroxide differentially modulates cardiac myocyte nitric oxide synthesis », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no 38, p. 15792-15797, sept. 2011, doi: 10.1073/pnas.1111331108.
- [29] E. N. Dedkova et L. A. Blatter, « Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase », *J. Physiol.*, vol. 587, no 4, p. 851-872, 2009, doi: 10.1113/jphysiol.2008.165423.
- [30] J. Sun et E. Murphy, « Protein S-Nitrosylation and Cardioprotection », *Circ. Res.*, vol. 106, no 2, p. 285-296, févr. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209452.

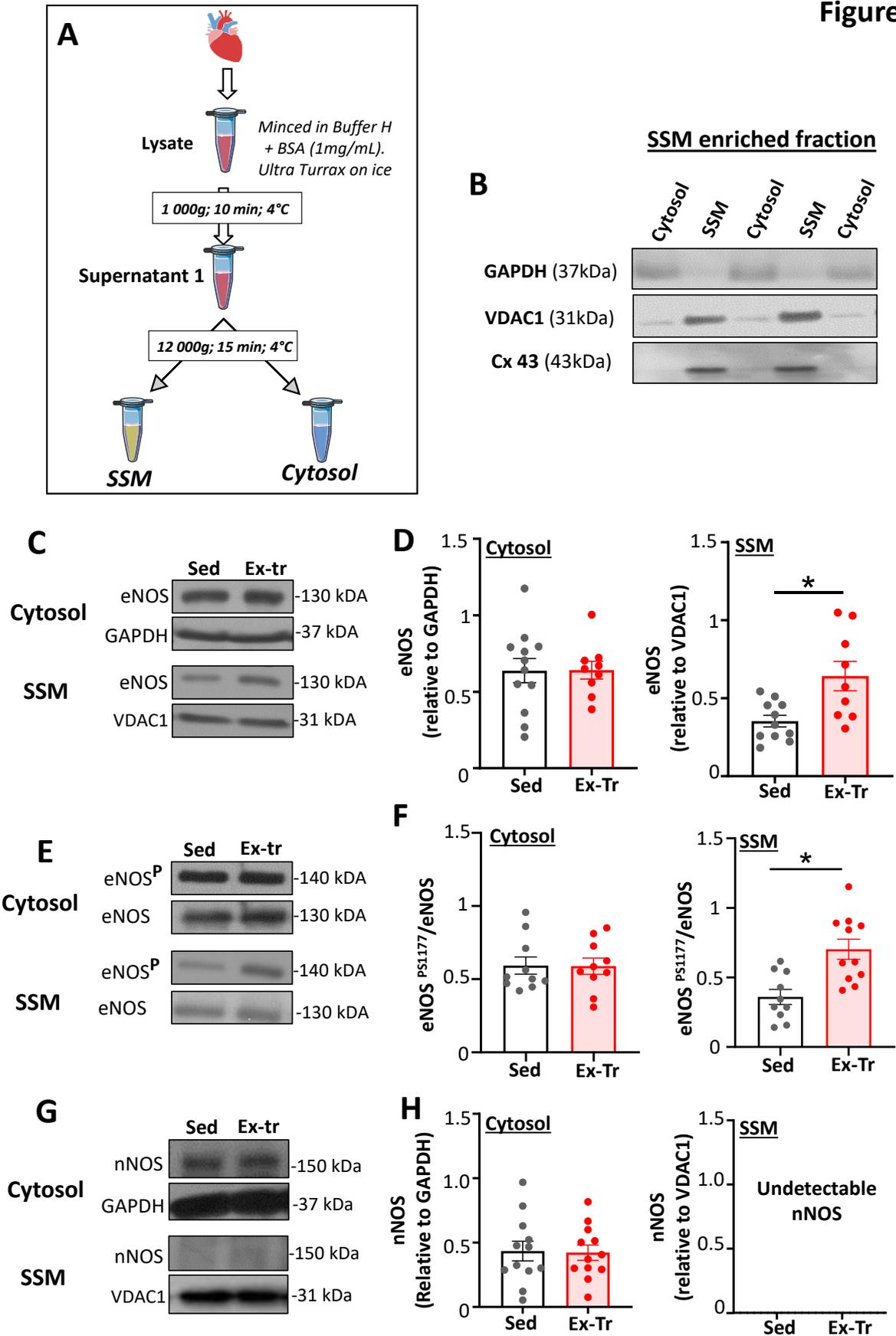
- [31] M. Marcil, K. Bourduas, A. Ascah, et Y. Burelle, « Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria », *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 290, no 4, p. H1549-1557, avr. 2006, doi: 10.1152/ajpheart.00913.2005.
- [32] J. Magalhães et al., « Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia », *Int. J. Cardiol.*, vol. 173, no 1, p. 40-45, avr. 2014, doi: 10.1016/j.ijcard.2014.02.011.
- [33] S. R. Jaffrey et S. H. Snyder, « The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins », *Sci. STKE*, vol. 2001, no 86, p. pl1-pl1, juin 2001, doi: 10.1126/stke.2001.86.pl1.
- [34] A. Görlach, K. Bertram, S. Hudecova, et O. Krizanova, « Calcium and ROS: A mutual interplay », *Redox Biol.*, vol. 6, p. 260-271, déc. 2015, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010.
- [35] D. C. Andersson et al., « Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes », *J. Physiol.*, vol. 589, no Pt 7, p. 1791-1801, avr. 2011, doi: 10.1113/jphysiol.2010.202838.
- [36] D. Boulghobra et al., « Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes », *Redox Biol.*, vol. 34, p. 101554, mai 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101554.
- [37] S. Cadenas, « ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 117, p. 76-89, mars 2018, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024.
- [38] Y. Olgar et al., « Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance », *Exp. Gerontol.*, vol. 110, p. 172-181, sept. 2018, doi: 10.1016/j.exger.2018.06.012.
- [39] A. C. R. Leite et al., « Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1797, no 6, p. 1210-1216, juin 2010, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.034.
- [40] K. M. Casin et al., « S-Nitrosoglutathione Reductase Is Essential for Protecting the Female Heart from Ischemia-Reperfusion Injury », *Circ. Res.*, vol. 123, no 11, p. 1232-1243, nov. 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313956.

- [41] J. Sun et al., « Disruption of Caveolae Blocks Ischemic Preconditioning-Mediated S-Nitrosylation of Mitochondrial Proteins », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no 1, p. 45-56, janv. 2012, doi: 10.1089/ars.2010.3844.
- [42] Z. Lacza, E. Pankotai, et D. W. Busija, « Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies », *Front. Biosci. Landmark Ed.*, vol. 14, p. 4436-4443, janv. 2009.
- [43] S. Gao et al., « Docking of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) to the Mitochondrial Outer Membrane A PENTABASIC AMINO ACID SEQUENCE IN THE AUTOINHIBITORY DOMAIN OF eNOS TARGETS A PROTEINASE K-CLEAVABLE PEPTIDE ON THE CYTOPLASMIC FACE OF MITOCHONDRIA », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no 16, p. 15968-15974, avr. 2004, doi: 10.1074/jbc.M308504200.
- [44] J. McMillin-Wood, P. E. Wolkowicz, A. Chu, C. A. Tate, M. A. Goldstein, et M. L. Entman, « Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 591, no 2, p. 251-265, juill. 1980, doi: 10.1016/0005-2728(80)90157-7.
- [45] A. V. Kuznetsov et R. Margreiter, « Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no 4, p. 1911-1929, avr. 2009, doi: 10.3390/ijms10041911.
- [46] W. R. García-Niño et al., « Cardioprotective kinase signaling to subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria is mediated by caveolar structures », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 112, no 2, p. 15, févr. 2017, doi: 10.1007/s00395-017-0607-4.
- [47] K. Boengler et al., « Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 16, no 8, p. 1649-1655, août 2012, doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01516.x.
- [48] M. Ruiz-Meana et al., « Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 68, p. 79-88, mars 2014, doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.01.001.
- [49] D. Soetkamp et al., « S-nitrosation of mitochondrial connexin 43 regulates mitochondrial function », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 109, no 5, p. 433, 2014, doi: 10.1007/s00395-014-0433-x.
- [50] W. Srisakuldee et al., « The FGF-2-triggered protection of cardiac subsarcolemmal mitochondria from calcium overload is mitochondrial connexin 43-dependent », *Cardiovasc. Res.*, vol. 103, no 1, p. 72-80, juill. 2014, doi: 10.1093/cvr/cvu066.

- [51] E. T. Chouchani et al., « Identification and quantification of protein S-nitrosation by nitrite in the mouse heart during ischemia », *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no 35, p. 14486-14495, 01 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.798744.
- [52] Y. Liu et Y. Zhang, « CHCHD2 connects mitochondrial metabolism to apoptosis », *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 2, no 4, mai 2015, doi: 10.1080/23723556.2015.1004964.
- [53] G. Amanakis et al., « Cysteine 202 of cyclophilin D is a site of multiple post-translational modifications and plays a role in cardioprotection », *Cardiovasc. Res.*, doi: 10.1093/cvr/cvaa053.
- [54] T. T. Nguyen, M. V. Stevens, M. Kohr, C. Steenbergen, M. N. Sack, et E. Murphy, « Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore », *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no 46, p. 40184-40192, nov. 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.243469.
- [55] M. J. Kohr et al., « Simultaneous Measurement of Protein Oxidation and S-nitrosylation during Preconditioning and Ischemia-Reperfusion Injury with Resin-Assisted Capture », *Circ. Res.*, vol. 108, no 4, p. 418-426, févr. 2011, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.232173.
- [56] A. H. K. Chang, H. Sancheti, J. Garcia, N. Kaplowitz, E. Cadenas, et D. Han, « Respiratory Substrates Regulate S-Nitrosylation of Mitochondrial Proteins through a Thiol-Dependent Pathway », *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, no 5, p. 794-804, mai 2014, doi: 10.1021/tx400462r.
- [57] C. Reboul, S. Tanguy, J. M. Juan, M. Dauzat, et P. Obert, « Cardiac remodeling and functional adaptations consecutive to altitude training in rats: implications for sea level aerobic performance », *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985, vol. 98, no 1, p. 83-92, janv. 2005, doi: 10.1152/jappphysiol.00214.2004.
- [58] O. Cazorla, S. Szilagyi, J.-Y. Le Guennec, G. Vassort, et A. Lacampagne, « Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction », *FASEB J.*, vol. 19, no 1, p. 88-90, janv. 2005, doi: 10.1096/fj.04-2066fje.
- [59] J. Fauconnier et al., « Effects of Palmitate on Ca<sup>2+</sup> Handling in Adult Control and ob/ob Cardiomyocytes : Impact of Mitochondrial Reactive Oxygen Species », *Diabetes*, vol. 56, no 4, p. 1136-1142, avr. 2007, doi: 10.2337/db06-0739.
- [60] X. Pan et al., « The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU) », *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no 12, p. 1464-1472, déc. 2013, doi: 10.1038/ncb2868.

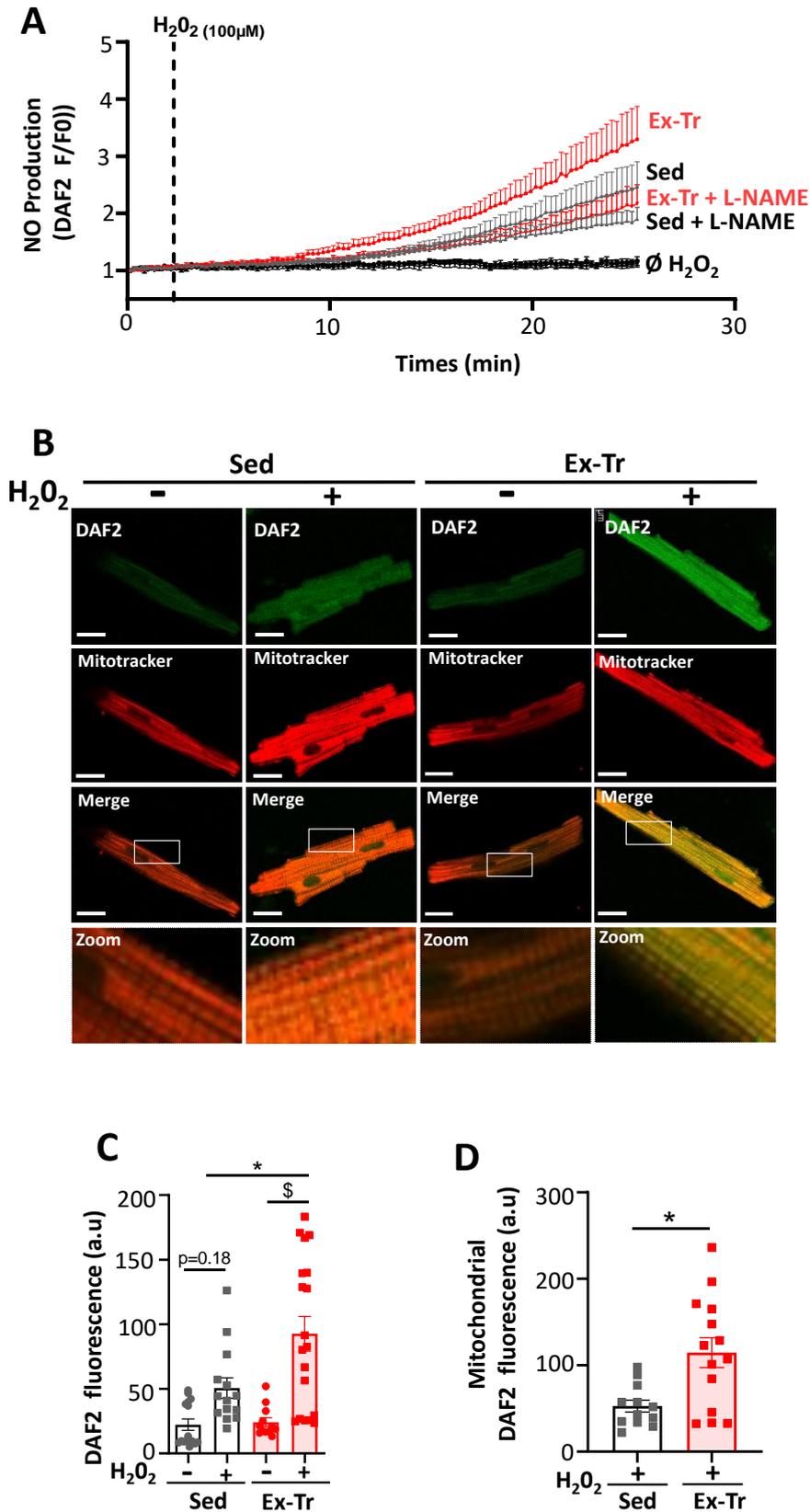
- [61] G. Klein et al., « RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts », *Nanotoxicology*, déc. 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27705051/> (consulté le déc. 02, 2020).
- [62] P. C. Carvalho, J. R. Yates, et V. C. Barbosa, « Improving the TFold test for differential shotgun proteomics », *Bioinformatics*, vol. 28, no 12, p. 1652-1654, juin 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts247.
- [63] F. Rohart, B. Gautier, A. Singh, et K.-A. Lê Cao, « mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration », *PLoS Comput. Biol.*, vol. 13, no 11, nov. 2017, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752.
- [64] C. Meziat et al., « Exercise training restores eNOS activation in the perivascular adipose tissue of obese rats: Impact on vascular function », *Nitric Oxide*, vol. 86, p. 63-67, mai 2019, doi: 10.1016/j.niox.2019.02.009.

Figure 1



**Figure 1: Exercise training increased the level of eNOS and eNOSP<sup>ser1177</sup> but not of nNOS in SSM. (A)-** Schematic representation of SSM isolation protocol. Heart lysates were fractionated by differential centrifugation. Centrifugation, homogenization and enzymatic reactions were performed at 4°C. **(B)-** Representative anti-GAPDH, anti-VDAC1 and anti-Connexin-43 western blot obtained on cytosolic and SSM subfractions. **(C, D)-** Effect of exercise training on eNOS level in cytosolic and SSM subfractions. **(C)-** Representative western blot of eNOS in cytosolic and SSM subfractions. **(D)-** eNOS level in cytosolic, **(left panel)** and SSM **(right panel)** subfractions analyzed by western blotting in hearts of Sedentary (Sed; n=4 hearts in triplicate) and exercise trained (Ex-Tr; n=3 hearts in triplicate) rats. eNOS level was expressed relative to GAPDH for cytosolic fraction and relative to VDAC1 for SSM. **(E, F)-** Effect of exercise training on eNOS phosphorylation at ser1177 in cytosolic and SSM subfractions. **(E)-** Representative western blot of eNOS-P<sup>ser1177</sup> in cytosolic and SSM subfractions. **(F)-** eNOS-P<sup>ser1177</sup> level in cytosolic, **(left panel)** and SSM **(right panel)** subfractions analyzed by western blotting in hearts of Sed (n=4 hearts in triplicate) and Ex-Tr (n=4 hearts in triplicate) rats. eNOS-P<sup>ser1177</sup> level was expressed relative to eNOS. **(G, H)-** Effect of exercise training on nNOS in cytosolic and SSM subfractions. Representative western blot of nNOS in cytosolic and SSM subfractions. **(G)-** Representative western blot of nNOS in cytosolic and SSM subfraction. **(H)-** Level of nNOS in cytosolic, **(left panel)** and SSM **(right panel)** subfractions analyzed by western blotting in hearts of Sed (n=4 hearts in triplicate) and Ex-Tr (n=4 hearts in triplicate) rats. nNOS level was expressed relative to GAPDH for cytosolic fraction and relative to VDAC1 for mitochondrial fraction (\*p<0.05 Sed vs Ex-Tr, t test) Data are presented as mean ± SEM.

Figure 2

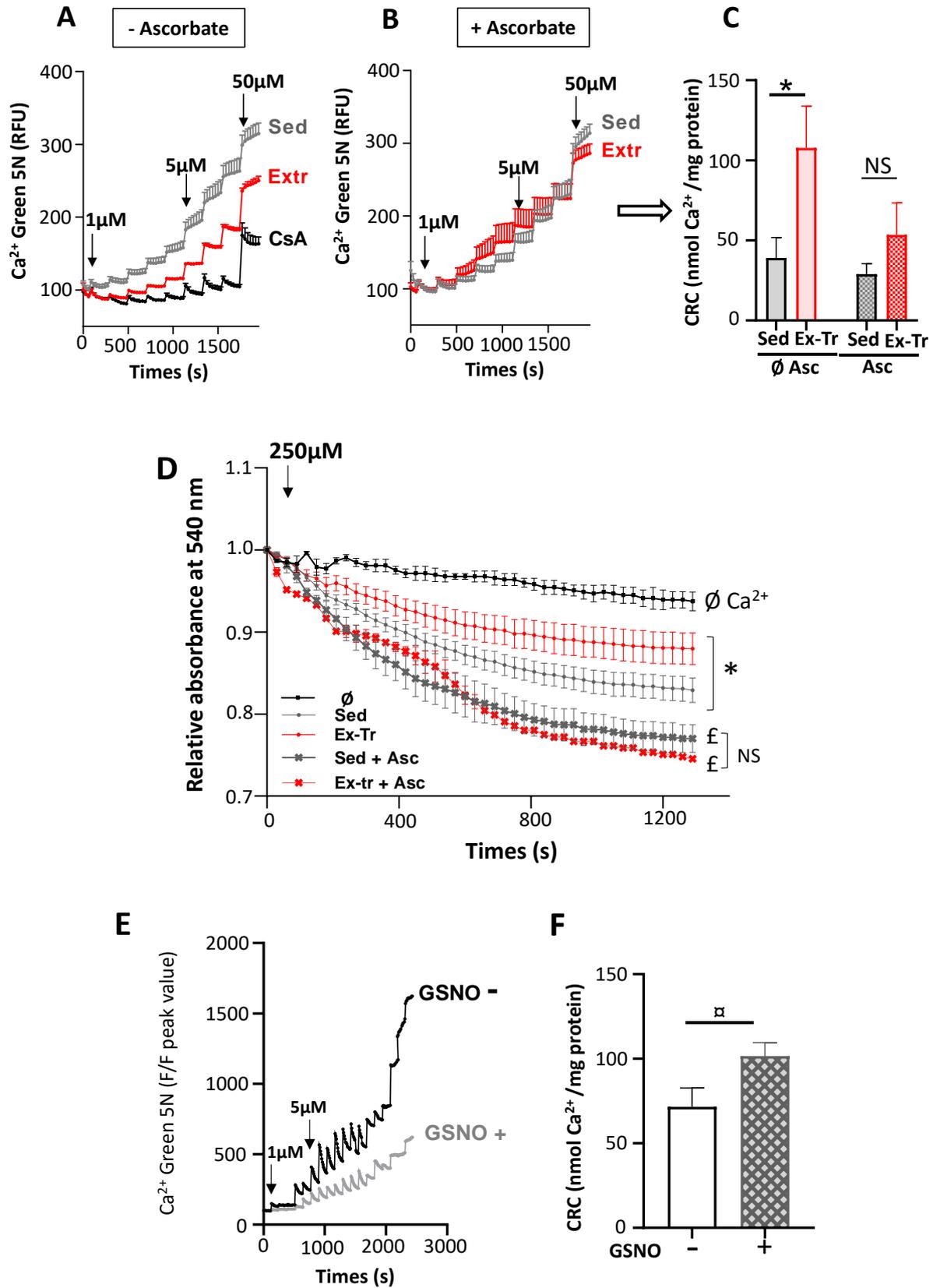


**Figure 2: Impact of exercise training on NO production in isolated cardiomyocytes. (A)-** Impact of exercise training on NO production in cardiomyocytes. Cardiomyocytes (100 000 cells/ml) from Sed and Ex-Tr hearts (n=5 hearts per group) were loaded with fluorescent dye sensitive to NO production (DAF2; 5 $\mu$ M) pre-treated or not with L-NAME (100  $\mu$ M) and stimulated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Fluorescence was measured every 10 sec during 30 min and was normalized to baseline fluorescence (F<sub>0</sub>). Changes in NO production was expressed as F/F<sub>0</sub>. **(B)-** Confocal images obtained on ventricular cardiomyocytes from Sed and Ex-Tr loaded simultaneously with DAF2 (green channel, emission 491/513 nm; 5 $\mu$ M) and Mitotracker Orange (red channel, emission/excitation 554/576 nm; 200 nM). Colocalization is represented by merged images. **(C)-** Quantitative analysis of DAF2 fluorescence intensity (meaning of 5-8 cells per conditions from 3 hearts per group); **(E)-** Quantitative analysis of mitochondrial DAF2 fluorescence intensity (meaning of 6 cells per conditions from 3 hearts per group). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. (\*p<0.05 Sed vs Ex-Tr; <sup>§</sup>p<0.05 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> effect, Anova followed by adjusted t-test).



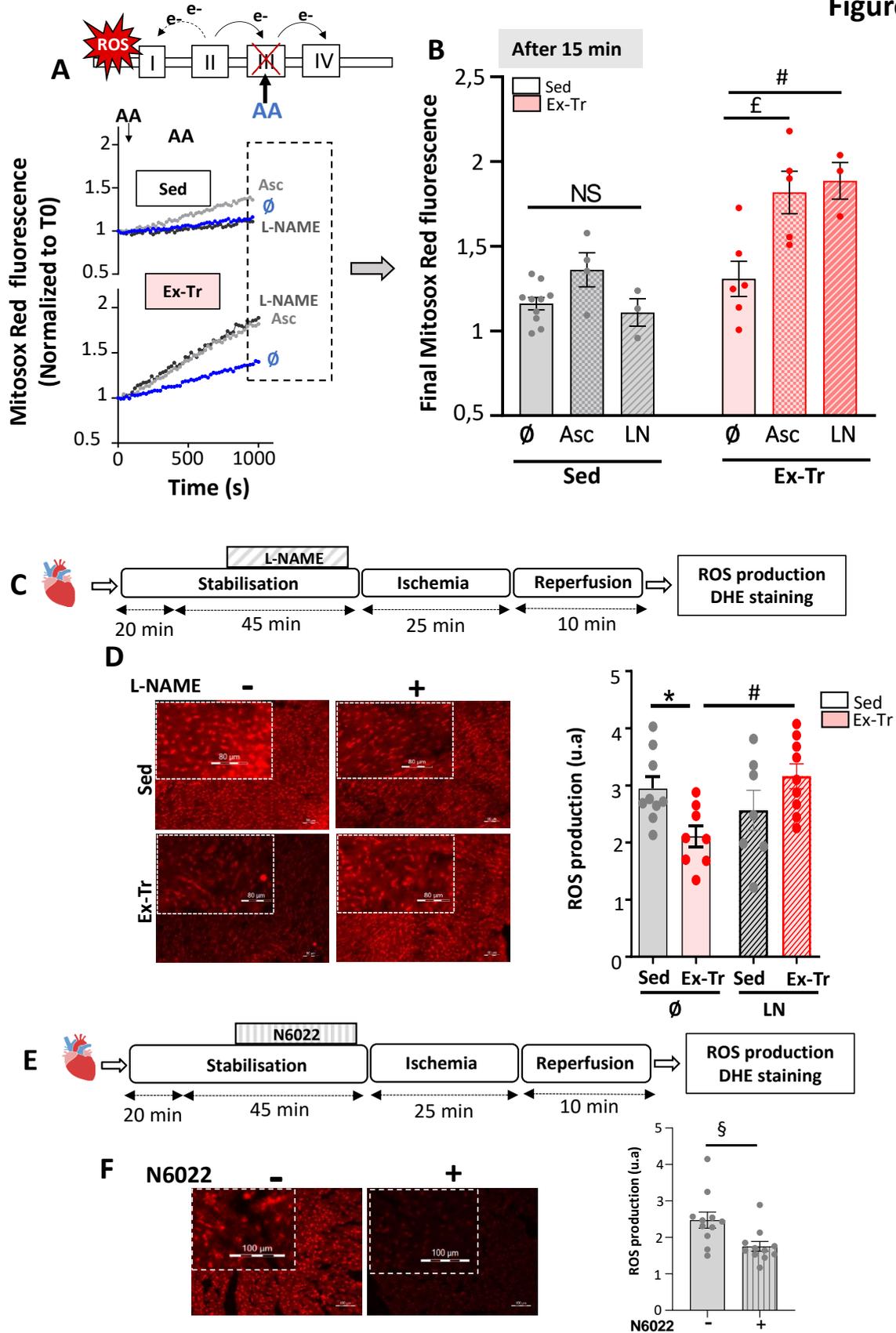
**Figure 3. Impact of exercise training on the pattern of SSM protein s-nitrosylation. (A)-** Schematic illustration of site-specific S-nitrosoproteomic analysis in SS-mitochondrial enriched fraction and total LV homogenate of Sed (n=3) and Ex-Tr (n=3) hearts. **(1)** Protein extraction **(2)** SNO occupancy was determined using the Iodoacetyl Tandem Mass Tag™ (iodoTMT™) labeling **(2)** and TMT enrichment **(3)** kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA). **(4)** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis on Q Exactive HF followed by data interpretation using the Mascot Daemon software. **(B,C)** Volcano plot of S-nitrosoproteomic data. 296 proteins with at least one TMT labeled modification were identified in total homogenates **(B)** and 345 proteins in the enriched SSM subfractions **(C)**. **(B,C)**- Volcano plot of the log<sub>10</sub> p value vs. the log<sub>2</sub> expression levels representing changes in S-nitrosylation of individual protein in response to exercise training relative to sedentary condition. The red dots representing mitochondrial proteins. **(D)**- Component 1 versus Component 3, using 95% confidence ellipses obtained by supervised partial least squares discriminant analysis (sPLS-DA). **(E)**-Heatmap displaying SSM samples proteins of the component 3 with altered abundance. The color scale illustrates the relative abundance of each protein across the 3 samples per group; blue and red indicate higher and lower expression compared to the median expression value (grey); respectively. The color intensity indicates the abundance of protein S-nitrosylation. **(F)**- Spectral counts of key proteins involved in differences between Sed and Ex-Tr S-nitrosoproteome obtained in SSM samples. (\*p<0.05 Sed vs Ex-Tr ; t-test with Welch's correction).

Figure 4



**Figure 4: Impact of exercise training on mitochondrial calcium retention capacity and mPTP activation: a key role for S-nitrosylation. (A,B,C)**- Calcium retention capacity (CRC) in SSM obtained from Sed (15 experiments from n=5 hearts) and Ex-Tr (12 experiments from n=4 in hearts) hearts was monitored using Calcium Green 5N probe (Em: 507nm; Ex: 536nm) as described in experimental procedure. **(A, B)**- Mean traces of CRC test. Each peak corresponds to calcium addition (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 50  $\mu$ M pulses of  $\text{CaCl}_2$ , changes in concentration are represented by arrows). Black curve corresponds to CRC representative trace in the presence of 2  $\mu$ M of cyclosporine A (CsA; 2 $\mu$ mol/L). The same procedure was performed in absence **(A)**- or presence **(B)**- of sodium L-ascorbate (1mmol/L) on SSM obtained from Sed (9 experiments from n=3 hearts) or Ex-Tr (12 experiments from n=4 hearts) hearts. **(C)**- Quantification of CRC in nmol $\text{Ca}^{2+}$  per mg protein (\*p<0.05, Sed vs Ex-Tr; ANOVA followed by adjusted t-test). **(D)**- Mitochondrial swelling assay was obtained on SSM from Sed and Ex-Tr hearts. The mitochondrial swelling was induced by adding  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu$ M) on SSM isolated from Sed (n=6) or Ex-Tr (n=5) hearts treated or not with sodium L-ascorbate (1mmol/L). Absorbance was monitored at 540 nm every 30 sec. (\*p<0.05 Sed vs Ex-Tr;  $^{\#}$ p<0.05 with ascorbate vs without ascorbate; repeated two-way Anova). **(E)**- Representative traces of CRC of SSM pre-treated or not with 500  $\mu$ M of GSNO. **(F)**- Quantification of CRC in presence (12 experiments from n=4 hearts) or absence (9 experiments from n=3 hearts) of GSNO ( $^{\#}$ p<0.05 GSNO (+) vs GSNO (-); t test). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

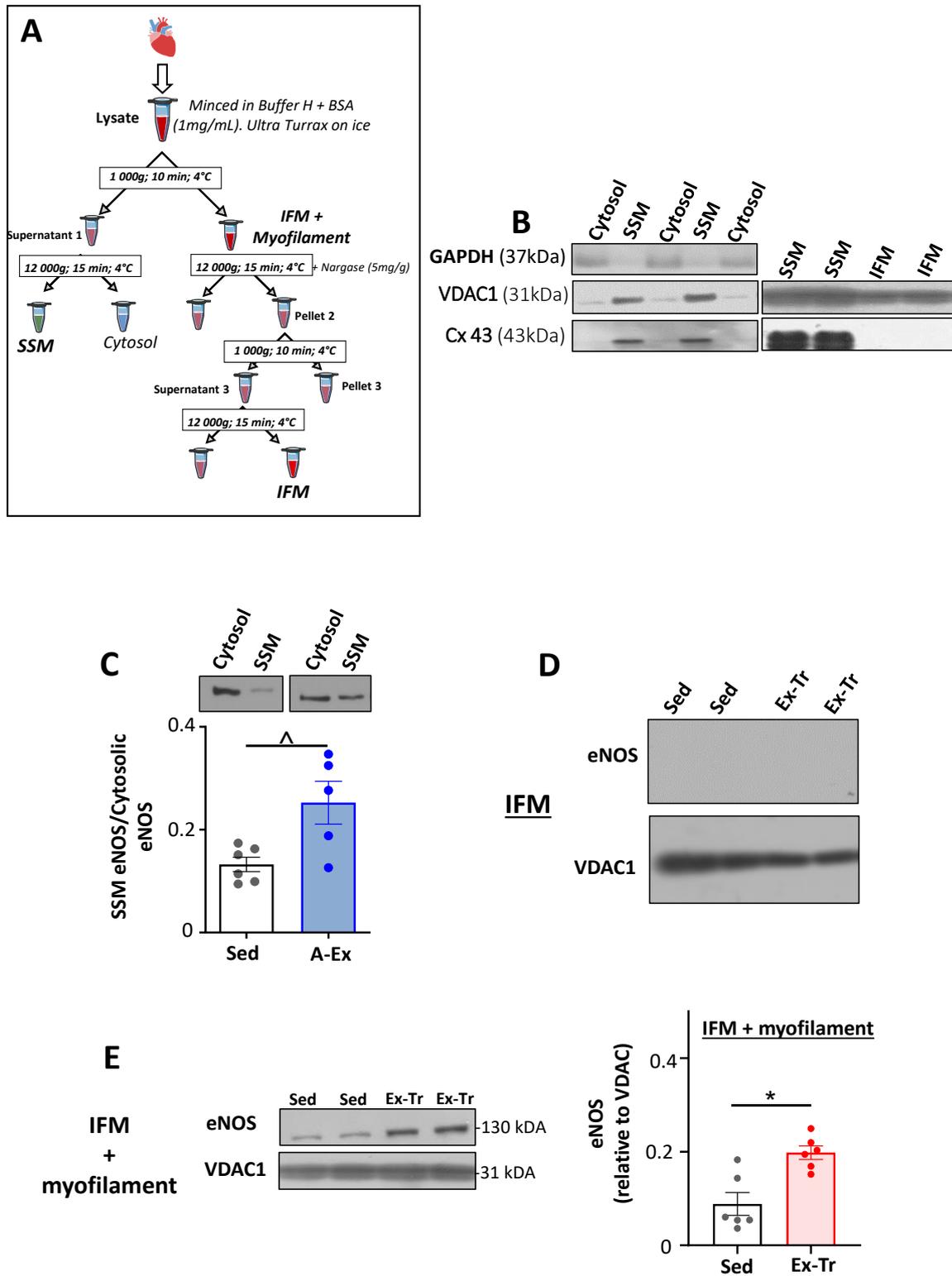
Figure 5



**Figure 5: Impact of exercise training on mitochondrial ROS production: a major role for protein s-nitrosylation. (A, B)-** Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (100 000 cells/mL) were loaded with fluorescent dye sensitive to mitochondrial ROS production, Mitosox Red (Ex: 510 nm; Em: 580 nm; 5  $\mu$ M), reported to detect superoxide anion production within mitochondria. Fluorescence was measured every 20 sec and normalized to baseline fluorescence ( $F/F_0$ ). Cardiomyocytes were stimulated with a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, antimycin A (AA, 10 $\mu$ M) to force mitochondria to produce ROS. Some myocytes were incubated for 30 min with either sodium L-ascorbate (Asc; 1 mM) or of L-NAME (LN; 100  $\mu$ M) prior to AA stimulation. **(B)-** Representative average fluorescence after 15 min ( $^{\text{f}}p < 0.05$  Ascorbate effect;  $^{\text{#}}p < 0.05$  L-NAME effect, Anova followed by adjusted t-test). **(C)-** Schematic illustration of the experimental protocol. Sed (n=4) and Ex-Tr (n=4) hearts were stabilized for 20 min and then perfused on a Langendorff apparatus for 45 min with or without L-NAME (LN; 100  $\mu$ M). Hearts were subject to global no-flow ischemia for 20 min followed by 10 min of reperfusion. **(D)-** Determination of ROS production by DHE staining after 10 min of post-ischemic reperfusion, in hearts of Sed and Ex-Tr animals pretreated or not with L-NAME (LN). Scale bar=80  $\mu$ m, the DHE fluorescence intensity was observed in 20 images of 3 to 4 hearts in each group ( $^*p < 0.05$  Ex-Tr vs Sed,  $^{\text{#}}p < 0.05$  with vs without L-NAME effect, (One way Anova followed by adjusted t-test). **(E)-** Schematic illustration of the experimental protocol. Control hearts were stabilized for 20 min and then perfused for 45 min with (n=4) or without (n=4) the GSNOR inhibitor N6022 (10  $\mu$ M). Hearts were subjected to global no-flow ischemia for 20 min followed by 10 min of reperfusion. **(F)-** Determination of ROS production by DHE staining 10 min after ischemia reperfusion, in hearts of control animals pretreated or not with N6022. Scale bar=80  $\mu$ m, the DHE fluorescence intensity was observed in 20 images of 4 hearts in each group. ( $^{\text{s}}p < 0.05$  with vs without N6022; t-test). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

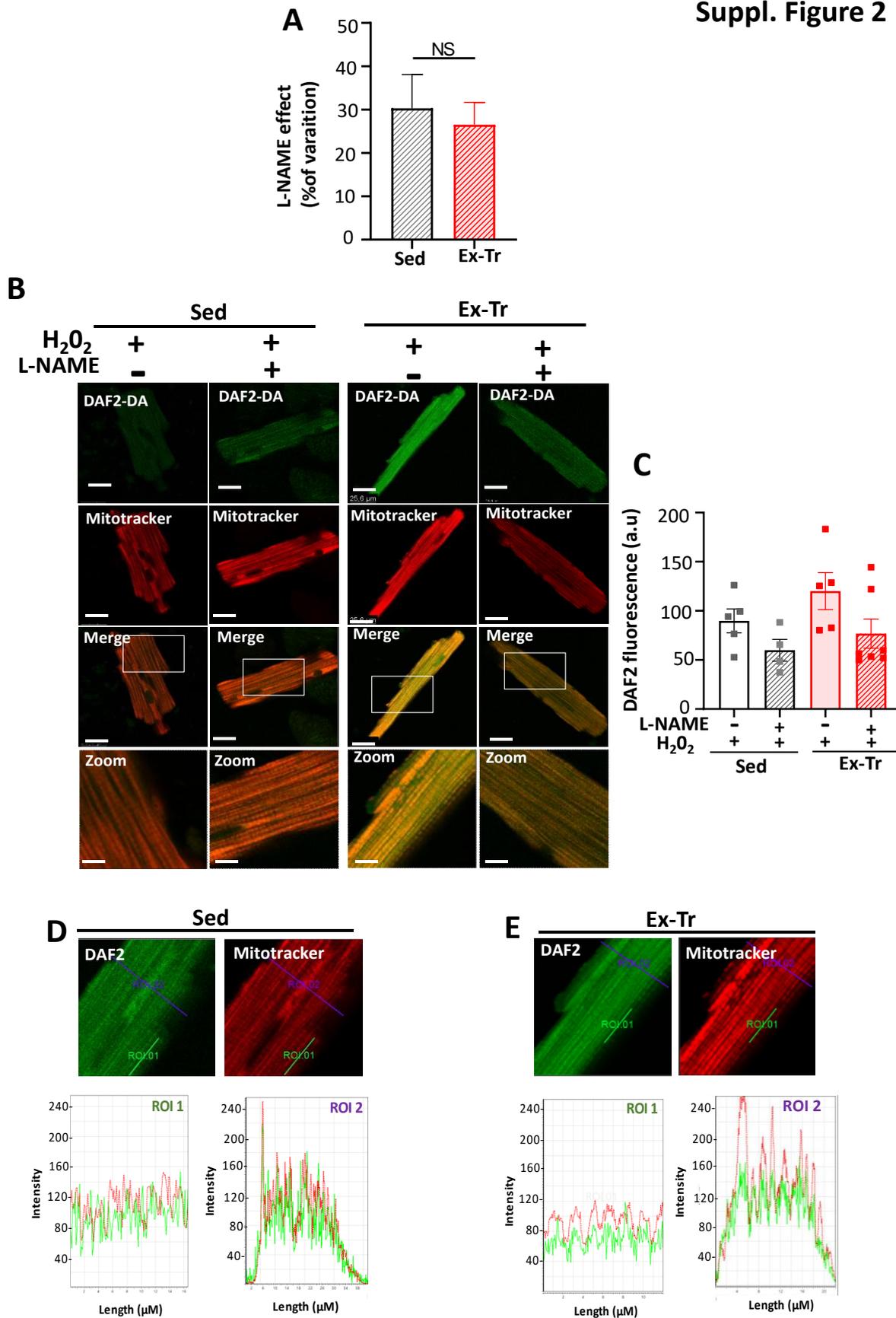
## 5. Données supplémentaires

Suppl. Figure 1



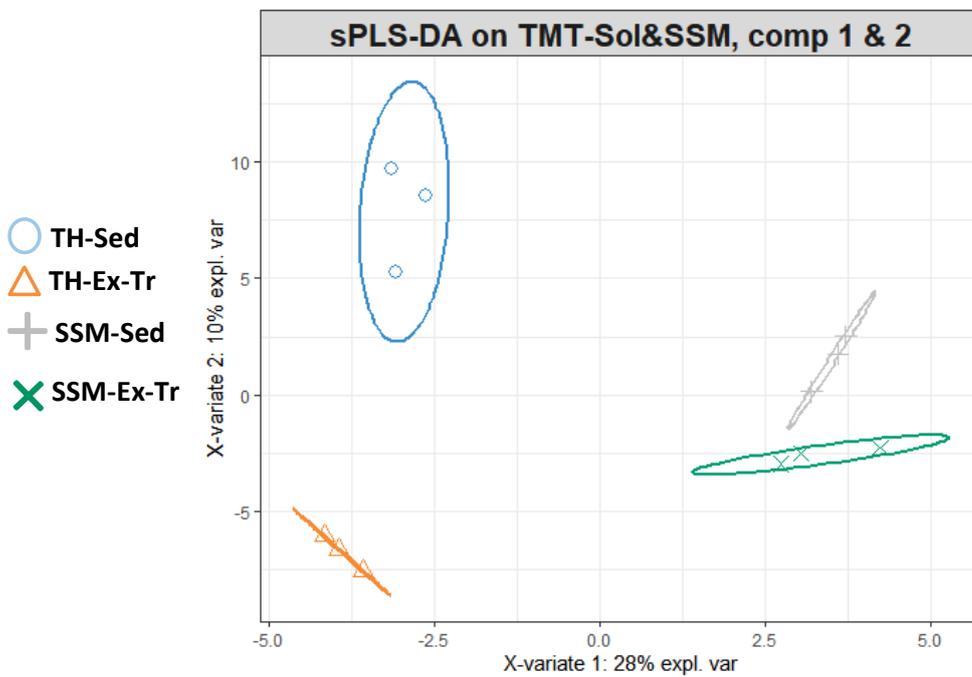
**Suppl Figure 1: (A)**- Schematic representation of the protocol of IFM isolation. Heart lysates were fractionated by differential centrifugation. Centrifugation, homogenization and enzymatic reactions are performed at 4°C. **(B)**- Representative anti-GAPDH, anti-VDAC1 and anti-Connexin-43 western blot in cytosolic, SSM and IFM subfractions. **(C)**- Effect of acute exercise (A-Ex; 35 min) on eNOS level in SSM subfraction. eNOS level in SSM subfraction analyzed by western blotting of Sedentary (Sed; n=3 in duplicate) and acutely exercised (A-Ex; n=3 in duplicate) rat hearts. SSM eNOS level was expressed relative to cytosolic eNOS ( $p < 0.05$  Sed vs A-Ex, t-test). **(D)** Representative anti-eNOS western blot in IFM subfraction. **(E)**- Representative western blot of eNOS in IFM + myofilaments subfraction. **(E)**- eNOS level in IFM + myofilament subfraction analyzed by western blotting in hearts of Sed (n=3 hearts in duplicate) and Ex-Tr (n=3 hearts in duplicate) rats ( $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr, t test).

## Suppl. Figure 2



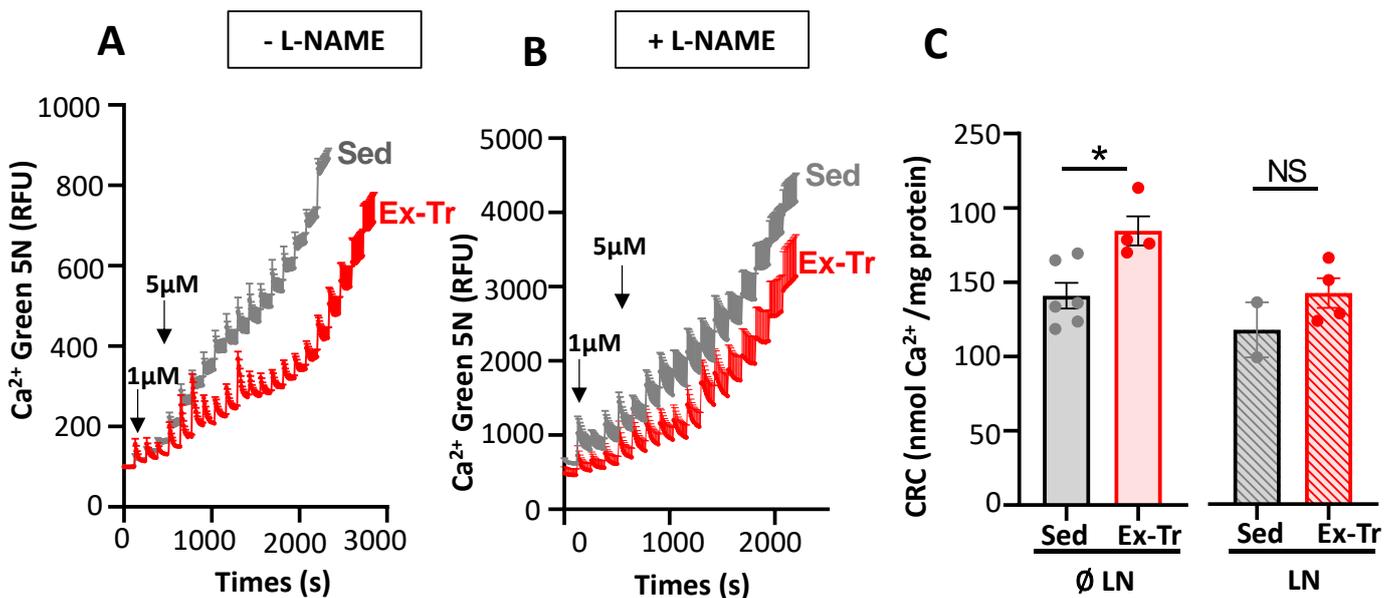
**Suppl Figure 2:** **(A)**- Effect of L-NAME on changes in DAF2 fluorescence in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cardiomyocytes of Sed and Ex-Tr hearts (n=5 hearts per group). **(B)**- Confocal images obtained on ventricular cardiomyocytes from Sed and Ex-Tr hearts loaded simultaneously with DAF2 (green channel, emission 491/513 nm; 5 μM) and Mitotracker Orange (red channel, emission/excitation 554/576 nm; 200 nM). Some myocytes were pre-incubated 30 min with L-NAME (100 μM). Colocalization is represented by merged images. **(C)** Quantitative analysis of DAF2 fluorescence. **(D,E)**- Spectra represented fluorescence intensity profile of two regions of interest (ROI 1 and ROI 2) for the green channel (DAF2) and the red channel (Mitotracker Orange) in Sed **(D)**- and Ex-Tr **(E)**- cardiomyocytes. Data are presented as mean ± SEM.

## Suppl. Figure 3



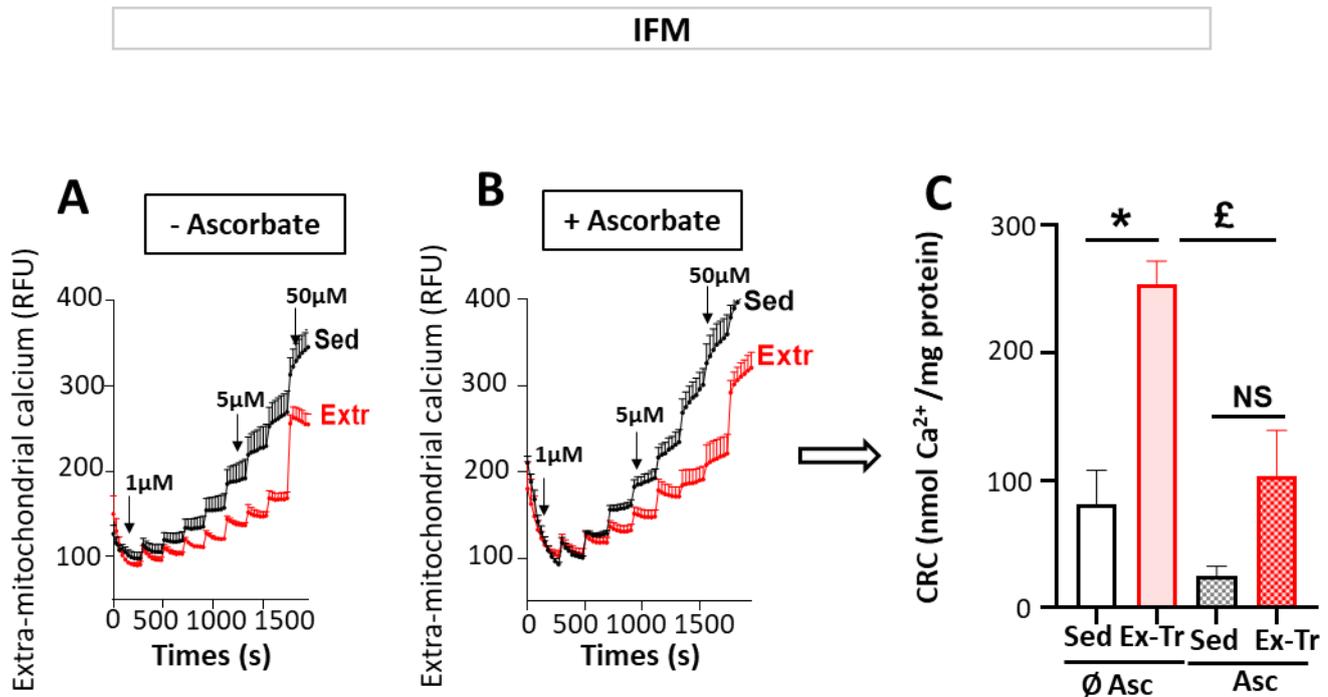
**Suppl Figure 3:** Supervised partial least squares discriminant analysis (sPLS-DA). Component 1 versus Component 2, using 95% confidence ellipses.

## Suppl Figure 4



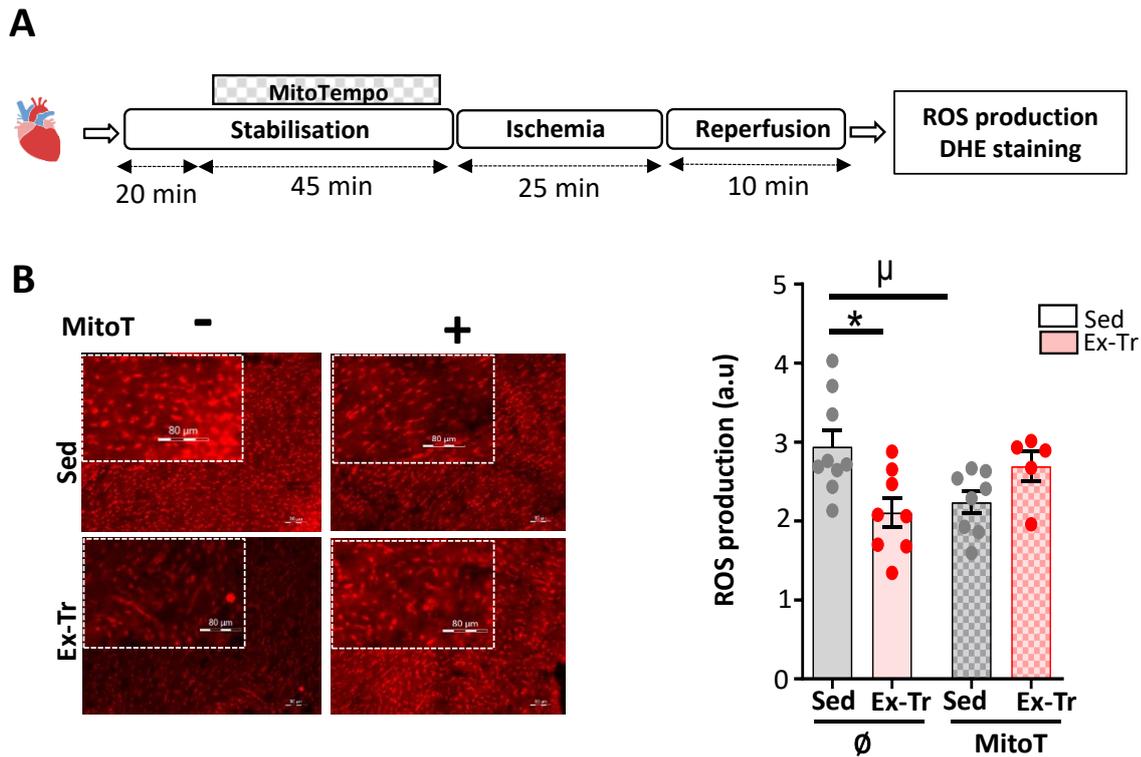
**Suppl Figure 4:** Impact of exercise training on mitochondrial calcium retention capacity and mPTP activation: a key role for NO. **(A,B,C)**- Calcium retention capacity (CRC) in SSM obtained from Sed (9 experiments from n=3 hearts) and Ex-Tr (9 experiments from n=3 in hearts) hearts perfused or not with L-NAME (100 μM) for 25 minutes, was monitored using Calcium Green 5N probe (Em: 507nm; Ex: 536nm) as described in experimental procedure. **(A, B)**- Mean traces of CRC test. Each peak corresponds to calcium addition (1 μM and 5 μM pulses of CaCl<sub>2</sub>, changes in concentration are represented by an arrow). The same procedure was performed on SSM obtained from hearts perfused without **(A)** - or with **(B)** - L-NAME (100 μM). **(C)**- Quantification of CRC in nmol Ca<sup>2+</sup> per mg protein (\*p<0.05 Sed vs Ex-Tr, t test). Data are presented as mean ± SEM.

## Suppl. Figure 5



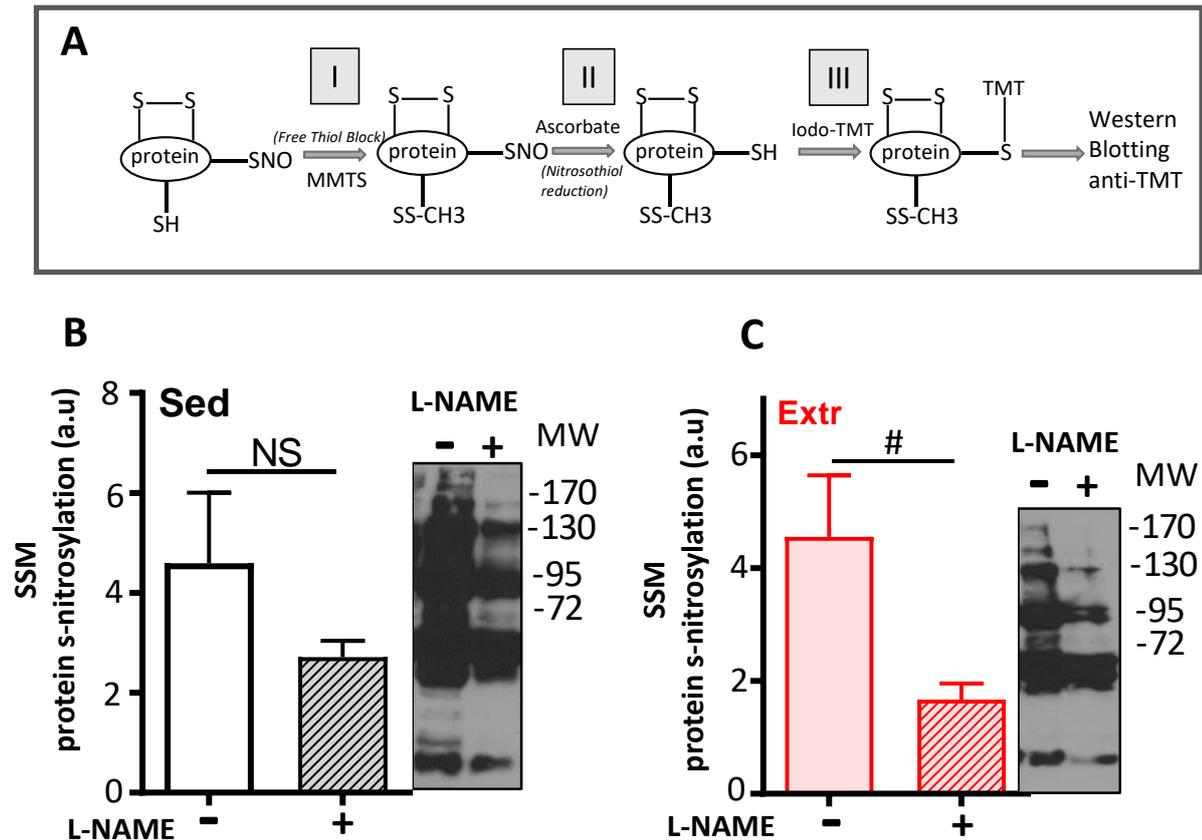
**Suppl Figure 5: Impact of exercise training on mPTP activation on IFM mitochondria. (A,B,C)-** Calcium retention capacity (CRC) in IFM obtained from Sed (9 experiments from n=3 hearts) and Ex-Tr (9 experiments from n=3 in hearts) hearts was monitored using Calcium Green 5N probe (Em: 507nm; Ex: 536nm) as described in experimental procedure. **(A, B)-** Mean traces of CRC test. Each peak corresponds to calcium addition (1 μM, 5 μM and 50 μM pulses of CaCl<sub>2</sub>, changes in concentration are represented by an arrow). The same procedure was performed in absence **(A)-** or presence **(B)-** of sodium L-ascorbate (1mmol/L) on IFM obtained from Sed (9 experiments from n=3 hearts) or Ex-Tr (9 experiments form n=3 hearts) hearts. **(C)-** Quantification of CRC in nmolCa<sup>2+</sup> per mg protein (\*p<0.05 Sed vs Ex-Tr, £p<0.05 Ex-Tr vs Ex-Tr Asc one way ANOVA). **(D)-** Mitochondrial swelling assay was obtained on IFM from Sed and Ex-Tr hearts suspended at 0.25 mg protein/ml in swelling buffer. The mitochondrial swelling was induced by adding Ca<sup>2+</sup> (250 μM) in IFM isolated from Sed (n=3) or Ex-Tr (n=3) hearts treated or not with sodium L-ascorbate (1mmol/L). Absorbance was monitored at 540 nm every 30 sec. Data are presented as mean ± SEM.

## Suppl. Figure 6



**Suppl Figure 6: Impact of exercise training and Mito-Tempo on ROS production during post-ischemic reperfusion:** (A) Schematic illustration of the experimental protocol. Sed (n=4) and Ex-Tr (n=4) hearts were stabilized for 20 min and then perfused on a Langendorff apparatus for 45 min with or without MitoTEMPO (MitoT; 0.1  $\mu$ M). Hearts were subject to global no-flow ischemia for 20 min followed by 10 min of reperfusion. (B)- Determination of ROS production by DHE staining after 10 min of post-ischemic reperfusion, in hearts of Sed and Ex-Tr animals pretreated or not with Mito-Tempo. Scale bar=80  $\mu$ m, the DHE fluorescence intensity was observed in 20 images (mean) of every 4 hearts in each group (\*p<0.05 ExTr vs Sed,  $\mu$  p<0.05 with vs without MitoT effect, Anova followed by adjusted t-test). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## Suppl. Figure 7



**Suppl Figure 7: (A)**-Schematic diagram of the biotin switch assay for detecting S-nitrosylated cysteines in SSM enriched fraction of Sed (n= 3 hearts per group in duplicate) and Ex-Tr (n= 3 hearts per group in duplicate) hearts. (I) Free thiols are made unreactive by methylthiolation with MMTS. (II) Nitrosylated residues are reduced by ascorbate. (III) Nascent free thiols are labeled by the thiol reactive biotinylated reagents (TMT). TMT can be detected by Western blot and is representative of S-nitrosylated protein. **(B,C)** Protein S-nitrosylation of SSM analyzed by Western blotting in hearts perfused (n=3 hearts) or not (n=3 hearts) with L-NAME (100  $\mu$ M) for 25min. (#p<0.05 L-NAME effect, t test) Data are presented mean  $\pm$  SEM.



# **DISCUSSION ET CONCLUSION**

## I. Discussion Générale

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer et/ou de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de stratégies naturelles permettant de protéger les mitochondries au cours de l'IR. Nous avons pu identifier dans notre première étude de thèse un antioxydant naturel, la sinapine, permettant de cibler spécifiquement le stress oxydant mitochondrial et ainsi de limiter la sensibilité des cœurs au syndrome d'IR, via une diminution de la production d'ERO au cours de la reperfusion post-ischémique. La deuxième étude de cette thèse nous a permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la cardioprotection induite par l'exercice physique et d'évaluer la place de la mitochondrie dans ce phénomène. En effet, nous avons pu démontrer que le ciblage des mitochondries par la voie de cardioprotection eNOS/NO/SNO contribue à expliquer les effets protecteurs de l'exercice physique.

Afin de ne pas être redondant avec les discussions des deux articles originaux de cette thèse, cette discussion sera centrée essentiellement sur l'importance des interactions entre troubles de l'homéostasie calcique mitochondriale et production d'ERO au cours de l'IR.

### 1. Activation du mPTP : stress calcique ou espèces réactives de l'oxygène ?

Il est maintenant bien admis que la mort cellulaire au cours de l'IR est fortement liée à l'activation du mPTP et à son impact sur le  $\Delta\Psi_m$  et l'intégrité mitochondriale. A ce jour, l'activation durable et irréversible de ce mPTP semble être expliquée, au cours de l'IR, par l'établissement d'un cercle vicieux entre la surcharge calcique matricielle et la production d'ERO d'origine mitochondriale. L'interaction entre ces deux facteurs semble être bidirectionnelle et diaphonique (Görlach et al., 2015). Au cours de ma thèse, j'ai en effet pu observer des effets qui vont dans le sens de cette interaction complexe entre  $Ca^{2+}$  et ERO. En effet, lors de la réalisation de tests de CRC, consistant à répéter des pulses de  $Ca^{2+}$  jusqu'à activation du mPTP, nous avons pu observer que l'ajout successif de calcium est associé à une augmentation de la production d'ERO au niveau mitochondrial (données non présentées). Il apparaît dès lors difficile d'exclure totalement le rôle des ERO dans l'activation du mPTP lors de ce type de test. Ces résultats confirment les données de la littérature sur le sujet (Hou et al., 2013; Limbu et al., 2015). Il semble ainsi évident que l'efficacité de la plupart des stratégies cardioprotectrices puisse être conditionnée par leurs capacités à agir sur l'un ou l'autre des paramètres de ce cercle vicieux afin de finalement prévenir l'activation du mPTP. Néanmoins, ce défi ne semble pas si simple. En effet, un grand nombre d'éléments de la signalisation essentielle au bon fonctionnement de la cellule (prolifération cellulaire, production d'ATP, couplage excitation-contraction) est dépendant de

l'homéostasie calcique et de la signalisation redox. C'est certainement pour cela que la plupart des stratégies globales, ne permettent pas de cibler spécifiquement ces désordres au cours de l'IR. En effet, l'utilisation d'antioxydants non spécifiques se sont montrés peu ou pas efficaces pour protéger le cœur au cours de l'IR (exemple de la Vitamine E et du Tempo) (Dikalova et al., 2010). En accord avec cette hypothèse nous avons pu montrer dans notre première étude de thèse que seule la sinapine ou le mitoTempo, qui permettent de cibler le stress oxydant au niveau de la mitochondrie, ont permis de protéger le cœur au cours de l'IR. L'acide sinapique, que l'on pourrait qualifier ici d'analogue cytosolique de la sinapine, s'est lui révélé inefficace. Ceci confirme les résultats de la littérature montrant l'importance de pouvoir cibler la production d'ERO mitochondriales pour protéger le cœur au cours de l'IR. Il semble néanmoins encore une fois difficile de dissocier la surcharge calcique de la surproduction d'ERO.

## 2. Le stress oxydant au centre des lésions d'IR ?

Dans la lignée des résultats obtenus avec la sinapine et le mitoTempo, à ce jour de nombreux autres antioxydants permettant de cibler la mitochondrie ont été développés et se sont montrés efficaces dans des modèles expérimentaux (Adlam et al., 2005). De manière intéressante, notre **ETUDE n°1** démontre pour la première fois que de telles caractéristiques peuvent aussi être retrouvées dans la nature.

Les effets cardioprotecteurs de l'exercice ont aussi longtemps été considérés comme étant liés à son impact sur les capacités enzymatiques antioxydantes (French et al., 2008; Hamilton et al., 2003). En effet, il est aujourd'hui largement décrit que l'exercice régulier réduit le risque de décès lors de l'IR myocardique en augmentant les défenses enzymatiques antioxydantes (MnSOD, Cu-ZnSOD et GPx) (Hamilton et al., 2001; Powers et al., 1998). Ceci serait notamment expliqué par l'activation du facteur nucléaire de transcription Nrf2 en réponse au stress oxydant aigu produit par chaque exercice physique (Done and Traustadóttir, 2016; Lee et al., 2012b; Powers et al., 2008). Dans notre travail, en accord avec des études précédentes (Farah et al., 2013), nous observons une diminution de la production d'ERO au cours de la reperfusion post-ischémique dans les cœurs d'animaux entraînés. L'interaction entre ERO et homéostasie calcique semble pouvoir jouer un rôle non négligeable dans la cardioprotection médiée par les enzymes antioxydantes. Ainsi, French et al. ont montré que l'exercice physique était à l'origine d'une augmentation de l'activité de la MnSOD (isoforme mitochondriale), permettant de limiter l'oxydation des protéines clés régulant les mouvements calciques au cours du

CEC (NCX, SERCA, phospholamban) (French et al., 2008). Ceci pourrait ainsi contribuer à expliquer la cardioprotection par l'exercice en limitant la surcharge calcique cytosolique. Nous pouvons néanmoins noter que dans notre modèle (5 semaines d'entraînement, 5 jours/semaine à 60% de la VMA) la cardioprotection que nous observons ne semble pas ou peu associée à une augmentation des défenses enzymatiques antioxydantes. En effet, nous n'avons pas observé de modifications du niveau d'expression de la MnSOD et seulement une légère tendance à une augmentation du niveau d'expression de la Cu-ZnSOD (isoforme cytosolique) (données non présentées). Néanmoins, l'activité de ces enzymes n'a pas été évaluée au cours de cette thèse. Des travaux précédents du laboratoire avaient en effet montré qu'un protocole d'exercice équivalent était capable d'impacter l'activité enzymatique de la SOD et de la GPx, sans effets sur la CAT (Farah et al., 2010). Des études complémentaires méritent donc d'être menées afin de mieux comprendre le rôle des défenses antioxydantes mitochondriales dans la prévention de l'activation du mPTP.

D'autres mécanismes que l'amélioration des défenses antioxydantes pourraient dès lors participer à expliquer les effets cardioprotecteurs de l'entraînement et la diminution de la production d'ERO au cours de l'IR. Ainsi, il semblerait que l'inhibition transitoire de la chaîne respiratoire pendant l'ischémie ou à la reperfusion permet également de limiter la surproduction d'ERO au cours de la reperfusion. Ainsi, Starnes et Olsen démontrent en 2007 que 16 semaines d'entraînement en endurance réduisent la production d'ERO dans les mitochondries cardiaques grâce à des adaptations du complexe I (Starnes et al., 2007). L'utilisation de roténone (un inhibiteur du complexe I) abolit la différence de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre les sédentaires et les entraînés (Starnes et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus suite à l'utilisation d'amobarbital, un inhibiteur du complexe I (Chen et al., 2006). Ceci est d'autant plus intéressant que le complexe I est considéré comme l'acteur majeur de la production d'ERO au cours de la reperfusion (Chouchani et al., 2016). Par ailleurs, celui-ci est également très sensible au stress oxydatif (Hansford et al., 1997). En s'appuyant sur ces données de la littérature, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans nos travaux, la sinapine pourrait limiter la production d'ERO dans les mitochondries via une interaction directe avec certains complexes de la CTE. En effet, certains extraits de polyphénols (flavonoïdes) se sont montrés efficaces pour inhiber les complexes de la CTE sur des préparations de mitochondries isolées intactes (Moini et al., 1999). Cette hypothèse nécessite néanmoins d'être investiguée par des études complémentaires.

Un autre élément d'intérêt dans notre travail pourrait être lié au rôle du NO sur l'activité de la CTE. En effet, l'inhibition du complexe I par S-nitrosylations permet également de ralentir la reprise d'activité de la chaîne respiratoire au moment de la reperfusion et ainsi de limiter la surproduction d'ERO (Chouchani et al., 2013). En effet, plusieurs études utilisant du nitrite ou des molécules

permettant de libérer du NO spécifiquement au niveau de la mitochondrie (mitoSNO), ont montré que cette stratégie permet de protéger le myocarde des lésions d'IR (Chouchani et al., 2013; Shiva and Gladwin, 2009). Cette protection semble être expliquée par la S-nitrosylation de la sous-unité ND3 (NADH déshydrogénase 3) du complexe I mitochondrial (Chouchani et al., 2013; Methner et al., 2014). Au cours de ce travail de thèse, nous n'avons pas observé de S-nitrosylation de la sous-unité ND3 du complexe I en réponse à l'exercice. Par contre, de manière intéressante, nous avons pu observer une S-nitrosylation de plusieurs protéines de la CTE, dont principalement la sous-unité NDUFA10 du complexe I et CHCHD2, connue pour relier le métabolisme à l'apoptose (Liu and Zhang, 2015). En accord avec cette hypothèse, l'utilisation d'ascorbate, pour dénitrOSyler, ou de L-NAME, afin de réduire la bio-disponibilité du NO, entraîne une forte augmentation de la production d'EROmt dans les cardiomyocytes de cœurs entraînés. Aucun effet majeur n'est par contre observé sur les cœurs d'animaux sédentaires. Ces résultats suggèrent fortement que la S-nitrosylation médiée par l'exercice physique permet de limiter la surproduction d'ERO mitochondriale en situation de stress.

Le NO pourrait aussi agir directement au niveau de la CTE, via son affinité pour le groupement hémique du complexe IV de la CTE, aboutissant à l'inhibition transitoire de la respiration mitochondriale (Cooper and Brown, 2008). Le NO peut également impacter d'autres cibles cellulaires impliquées dans la régulation de la production d'ERO. Ainsi, dans notre modèle nous avons pu observer que l'exercice physique est à l'origine d'une S-nitrosylation de la Cx43 mitochondriale. La Cx43 est reconnue comme étant capable d'impacter la fonction respiratoire mitochondriale en agissant sur la CTE (Boengler et al., 2012; Ruiz-Meana et al., 2014). Cette protéine uniquement présente au niveau des SSM est connue pour jouer un rôle clé dans la cardioprotection induite par le NO (Soetkamp et al., 2014). En effet, la Cx43 fortement sensible à l'oxydation au cours de l'IR, est une des cibles S-nitrosylées par des stratégies de cardioprotection telles que l'IPC ou la supplémentation en nitrite (Soetkamp et al., 2014). A ce jour, la manière dont la Cx43 participe à la cardioprotection par l'exercice demeure débattue. Néanmoins, celle-ci semblerait pouvoir interagir avec les complexes I et II de la CTE, modulant ainsi la production d'ERO au cours de la reperfusion.

### **3. Le rôle des troubles de l'homéostasie calcique au centre des lésions d'IR ?**

Le NO, notamment via la SNO, joue donc un rôle clé dans la régulation de la production d'ERO au cours de l'IR. Ceci semble pouvoir contribuer à limiter l'établissement d'un cercle vicieux entre ERO

et  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de l'IR. L'impact du NO sur l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  est à ce jour clairement moins décrit. La forte augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intra-mitochondrial à la reperfusion représente un élément clé dans l'ouverture du mPTP. Comme déjà discutée dans la littérature scientifique, la déplétion en ATP au cours de l'ischémie perturbe l'activité d'un certain nombre d'échangeurs/pompes calciques. Ceci conduit à une surcharge calcique qui contribue elle-même à altérer l'homéostasie des cardiomyocytes en augmentant la production d'ERO, l'activation des calpaines, la dysfonction contractile et la mort cellulaire. Au cours de la reperfusion, la restauration des niveaux d'ATP est essentielle au maintien de l'homéostasie cardiaque mais conduit à une exacerbation de la production d'ERO.

Ainsi, les RyR responsables de la libération dans le cytosol de calcium par le RS au cours du phénomène de « *Calcium-induced Calcium release* », contiennent de nombreuses cystéines et sont donc à la fois sensibles au NO et au stress oxydant (Meissner, 2010). L'oxydation des thiols au cours de l'IR contribue ainsi à augmenter les fuites de calcium du RS (Terentyev et al., 2008). De manière intéressante, nous observons dans notre **ETUDE 2**, que l'exercice physique est à l'origine d'une S-nitrosylation de RyR2. Ceci pourrait permettre de prévenir son oxydation au cours de l'IR et ainsi limiter les fuites de calcium au cours de la reperfusion post-ischémique (Gonzalez et al., 2010). Néanmoins, cette hypothèse n'est pas si évidente, puisque d'autres travaux ont pu montrer qu'une S-nitrosylation aberrante du RyR pouvait au contraire conduire à une aggravation des fuites de  $\text{Ca}^{2+}$  et participerait ainsi à des troubles de la fonction cardiaque (Fauconnier et al., 2010). Une autre cible clé dans la régulation de la concentration calcique cytosolique est la protéine SERCA. Celle-ci est responsable de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS, permettant la relaxation myocardique mais aussi la régulation des concentrations intracellulaires en  $\text{Ca}^{2+}$  au cours de la diastole. Il a préalablement été rapporté que l'oxydation de SERCA inhibe son activité ATPasique et donc le repompage du calcium par le RS. Ceci peut contribuer à aggraver la surcharge calcique cytosolique et ainsi favoriser l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale. Dans nos travaux, nous avons observé une tendance à l'augmentation de la S-nitrosylation de SERCA sans pour autant atteindre de significativité (fold change=1,67 ; p=0,1). A ce jour, il a déjà bien été décrit que l'exercice physique permet de moduler l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours du CEC via notamment une amélioration des cinétiques de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par SERCA (Farah et al., 2010; Wisløff et al., 2002). De plus, les travaux de l'équipe de Powers ont montré qu'une partie des effets cardioprotecteurs de l'exercice physique pouvait être expliqué par une prévention de l'oxydation irréversible de certaines protéines clés régulant les mouvements calciques au cours de l'IR (SERCA, NCX, PLB) (French et al., 2008). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'utilisation d'antioxydants a déjà été montrée comme permettant de limiter les troubles de l'homéostasie calcique au cours de l'IR (Yeung et al., 2008).

Dans notre travail, l'exercice pourrait aussi impacter directement l'activation du mPTP via ses effets sur l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. En effet, il a été montré que la modulation de l'activité du MCU, par délétion de l'unité régulatrice MCUB, permet de limiter l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie au cours de l'IR et est à l'origine d'une diminution de la vulnérabilité du cœur (Huo et al., 2020). Dans notre modèle, il est dès lors étonnant de noter que bien que les cœurs et les mitochondries des animaux entraînés soient protégés contre le stress calcique, les cinétiques d'entrée de calcium dans les SSM, mesurées sur SSM isolées en présence de CsA, sont supérieures chez les Ex-Tr comparées aux Sed. Ces résultats suggèrent que l'exercice pourrait contribuer à augmenter l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie par le MCU. A notre connaissance, il s'agit de la première étude ayant examiné l'impact de l'entraînement physique sur ce paramètre, et à ce jour, l'impact de l'exercice physique sur le niveau d'expression du MCU ou de ces protéines régulatrices (MICU 1 et 2, EMRE) dans le muscle cardiaque n'a jamais été évalué. Des données existent tout de même sur le muscle squelettique. Ainsi, au niveau musculaire, 9 semaines d'activité physique entraînent une augmentation du niveau d'expression du MCU (Zampieri et al., 2016). Si ces résultats sont confirmés à l'échelle du muscle cardiaque, ils pourraient contribuer à expliquer cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  majorée chez les animaux Ex-Tr. Ainsi, les mitochondries de cœurs entraînés semblent être capables de mieux capter le  $\text{Ca}^{2+}$  tout en étant moins sensible à la surcharge calcique. Ceci pourrait non seulement contribuer à expliquer la meilleure capacité des mitochondries cardiaques de cœurs entraînés à augmenter la synthèse d'ATP en réponse à l'exercice, mais aussi leurs capacités à résister à une situation de stress aboutissant à une surcharge calcique, telle que l'ischémie reperfusion.

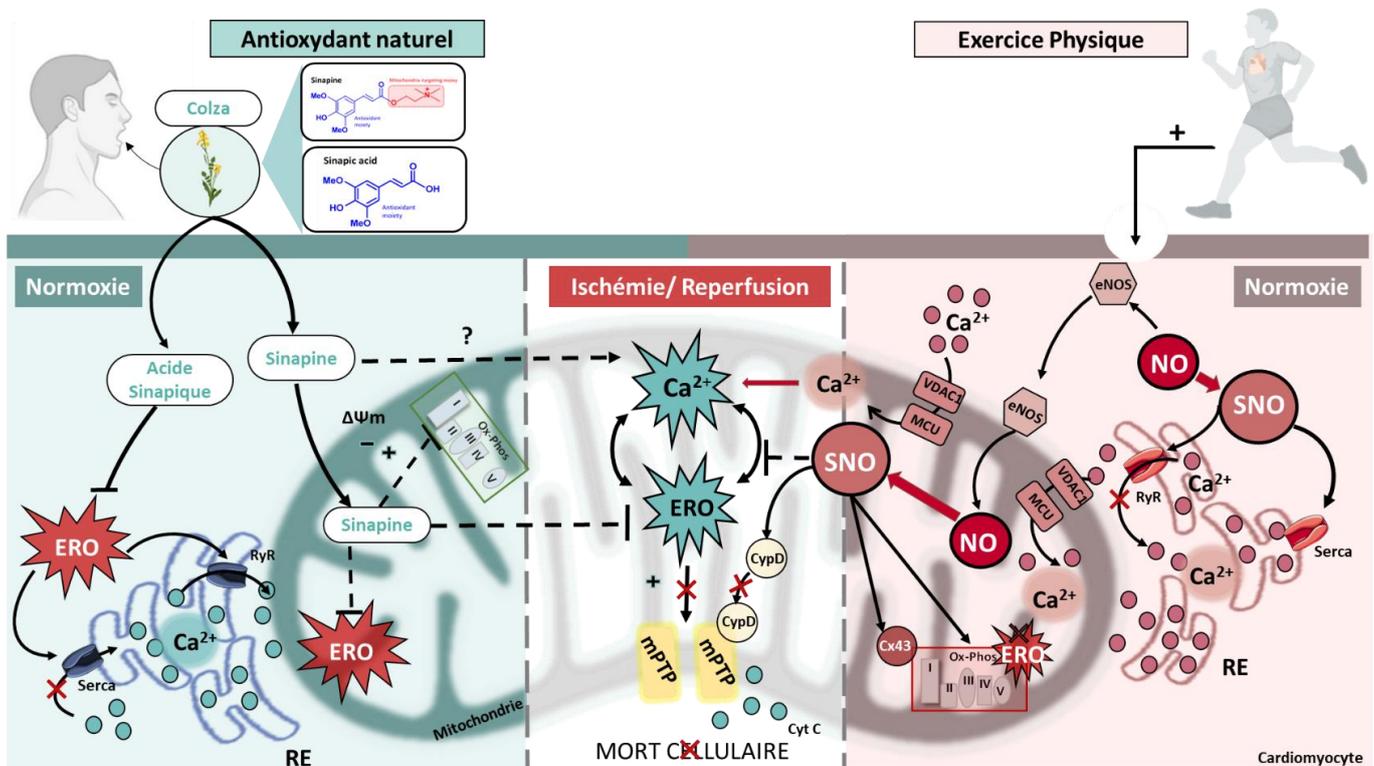
#### 4. Le mPTP, une cible de l'exercice ?

L'exercice pourrait aussi jouer directement sur l'activation du mPTP. La CypD est aujourd'hui bien décrite comme un acteur clé de l'activation du mPTP en réponse au stress oxydant et au  $\text{Ca}^{2+}$ . Il a préalablement été démontré dans la littérature scientifique que la S-nitrosylation de la CypD préserve l'intégrité mitochondriale pendant l'IR (Amanakis and Murphy, 2020; Bibli et al., 2019). En effet, au cours de l'ischémie, l'augmentation du calcium mitochondrial conduit à la dé-acylation de la CypD, rendant la protéine plus sensible à l'oxydation. Son oxydation augmente son interaction avec le mPTP qui s'ouvre de manière permanente (Amanakis et al., 2017). Ainsi, la S-nitrosylation de la CypD au cours de l'ischémie pourrait permettre de limiter ou empêcher son oxydation au cours de la reperfusion. En accord avec ces résultats, Nguyen TT et al., démontrent que la S-nitrosylation de la CypD au niveau de résidu cystéine 203 prévient son oxydation et sa translocation au mPTP (Nguyen et al., 2011).

Conformément à ses données de la littérature, nous démontrons que l'exercice physique augmente la S-nitrosylation de la Cys203 de la CypD. Ceci pourrait être un élément déterminant afin d'expliquer la cardioprotection par l'exercice. Ces dernières années, de nombreuses stratégies ont tenté de bloquer l'interaction entre la CypD et le mPTP afin de limiter son activation au cours de l'IR. L'utilisation de cyclosporine A, s'est montrée efficace pour protéger le myocarde des lésions de reperfusion en inhibant l'ouverture du mPTP via sa fixation sur la cyclophiline D et l'inhibition de son activité peptidyl-isomérase (Griffiths and Halestrap, 1993). Son administration à la reperfusion retarde la mort cellulaire après anoxie *in vitro* (Nazareth et al., 1991) et diminue la taille d'un infarctus dans des modèles d'ischémie-reperfusion *in vivo* (Skyschally et al., 2010). Plusieurs études cliniques ont également permis de montrer un effet cardioprotecteur de la cyclosporine A chez l'Homme (Piot et al., 2008). Malgré des effets positifs sur l'animal, et une première étude pilote (Piot et al., 2008), un essai clinique international mené sur plus de 800 patients (Mewton et al., 2015) a obtenu des résultats décevants (Cung et al., 2015). Ces résultats mettent peut-être en avant la difficulté d'agir sur une seule cible thérapeutique. En effet, une molécule seule ne semble que difficilement être capable de mimer les effets de stratégies pléiotropiques telles que l'exercice physique. Dans ce contexte, continuer à décortiquer les nombreuses cibles de l'exercice physique semble pouvoir être une stratégie prometteuse, afin d'être capable un jour de proposer une stratégie multi-cible efficace.

## II. Conclusion

En conclusion, l'ensemble de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'efficacité de stratégies naturelles ciblant directement la mitochondrie. En effet, limiter l'établissement d'un cercle vicieux entre la surcharge calcique et la production d'ERO au cours de l'IR semble être une stratégie efficace afin de limiter l'activation du mPTP et les lésions associées au cours de l'IR. Nous avons pu mettre en avant l'intérêt de pouvoir limiter l'établissement de ce cercle vicieux en agissant soit sur la production d'ERO et/ou sur la sensibilité des mitochondries à une surcharge calcique (Figure 44). Dans ce travail, nous avons ainsi pu montrer que cibler spécifiquement le stress oxydant mitochondrial, est une stratégie qui pourrait permettre aux antioxydants de retrouver une place de choix dans la course aux stratégies de cardioprotection. Par ailleurs, nous avons aussi pu montrer qu'en réponse à l'exercice physique le ciblage de protéines clés du fonctionnement mitochondrial par S-nitrosylation contribue à expliquer ses effets bénéfiques. Bien que la cardioprotection par l'exercice résulte de phénomènes complexes et pléiotropiques, rendant inabordable l'idée d'une stimulation pharmacologique parfaite des effets de l'exercice physique, décortiquer les nombreuses voies de signalisation aboutissant à protéger le cœur, pourrait amener à la découverte de nouvelles cibles et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.



**Figure 44 :** Représentation des effets d'une supplémentation en sinapine et de l'exercice physique sur la limitation du cercle vicieux entre le Ca<sup>2+</sup> et les ERO au niveau mitochondrial.

# **PERSPECTIVES**

## Perspectives

Les effets bénéfiques de la sinapine sur le stress oxydant mitochondrial ont été obtenus *in cellulo* et *ex vivo* (**Etude 1**). Pour aller plus loin et pour confirmer nos résultats, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'un protocole de supplémentation avec de la sinapine (ou du colza) sur la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion. Des études réalisées avec du MitoQ, suggèrent que 14 jours de supplémentations avec 500  $\mu$ M de MitoQ dans l'eau de boisson suffisent pour limiter la production d'EROmt et protéger le cœur au cours de l'IR (Adlam et al., 2005). Il serait donc intéressant d'évaluer si une supplémentation à base de sinapine ou une alimentation riche en colza conduit à des résultats similaires.

De nombreuses études cliniques ont déjà été consacrées à évaluer l'effet bénéfique d'antioxydants naturels à action globale sur la fonction cardiovasculaire (Ex : Polyphénols). Cependant, encore aucune étude n'a mené d'essais cliniques sur des antioxydants naturels ciblant spécifiquement les mitochondries. A notre connaissance, une seule étude clinique basée sur un traitement de 6 semaines avec du MitoQ (une prise de 20mg/jour) a été réalisée et s'est montrée efficace pour améliorer la fonction vasculaire au cours de l'hypertension (Rossman Matthew J. et al., 2018). La réalisation d'un protocole clinique chronique basé sur une supplémentation en sinapine chez des patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaire, permettrait de valider chez l'humain les données acquises en modèle animal et de développer de nouvelles stratégies préventives naturelles de la fonction cardiovasculaire.

Dans cette même étude, les sondes fluorescentes utilisées ne nous permettent pas de trancher sur la nature des ERO visées par cet antioxydant. Cependant, des études précédemment publiées avec de l'acide sinapique démontrent que celui-ci est capable de piéger le superoxyde et le radical hydroxyle (Chen, 2016). Considérant que la sinapine et l'acide sinapique partagent le même groupement phénol responsable de leurs activités antioxydantes, nous pourrions supposer que la sinapine est spécifique du même type d'espèces radicalaires ( $d'O_2^{\bullet}$  et  $OH^{\bullet}$ ). Ainsi, des expérimentations complémentaires méritent d'être menées afin de déterminer les mécanismes d'action de la sinapine. Une des hypothèses est que la sinapine aurait la capacité d'interagir avec certains complexes de la CTE (Moini et al., 1999). Il serait donc intéressant par des expérimentations de respiration mitochondriale d'évaluer l'activité des complexes (complexe I et III majoritairement) après incubation avec de la sinapine et en présence ou non d'inhibiteurs de chacun de ces complexes.

On sait aujourd'hui que les stratégies visant à limiter le stress oxydant, atténuent la sensibilité des mitochondries au calcium et empêchent l'activation du mPTP. Pour cela, il semblerait pertinent d'évaluer la sensibilité des mitochondries au calcium suite à un protocole de CRC en présence de sinapine afin de déterminer si les effets protecteurs de la sinapine sont associés à une moindre activation du mPTP.

Un des résultats majeurs de ce travail de thèse est que la protection des mitochondries cardiaques par l'exercice physique peut-être en partie expliqué par la S-nitrosylation de protéines clés du fonctionnement mitochondriale. Parmi elles, la Cx43 et la Cyp D ont déjà été largement rapportées dans la littérature scientifique pour leur rôle clé dans différentes stratégies de cardioprotection. Il serait intéressant à l'aide de modèles transgéniques, d'évaluer l'implication de la S-nitrosylation de chacune de ces protéines dans la cardioprotection par l'exercice, en mutant les cystéines impliquées dans la cardioprotection dans notre modèle d'exercice physique.

De manière originale, on démontre pour la première fois que la voie eNOS/NO/SNO se transloque vers les mitochondries pour aboutir à une cardioprotection. Nous n'avons pas pu dans ce travail élucider les mécanismes sous-jacents expliquant ce phénomène. Dans une récente étude, Sun et al. ont pu démontrer suite à un pré-conditionnement ischémique que Cav-3 est impliquée dans la transduction de la signalisation cardioprotectrice eNOS/NO/SNO vers les mitochondries (Sun et al., 2012). En effet, ils observent que la délétion de Cav-3 chez des souris, est à l'origine d'une perte des effets protecteurs du pré-conditionnement ischémique. Ceci serait expliqué par une ablation des effets du pré-conditionnement sur le niveau de SNO des SSM (Sun et al., 2015b). Ainsi il serait intéressant de mener des études complémentaires afin d'évaluer le rôle de Cav-3 dans la translocation de la eNOS en réponse à l'exercice.

D'autre part, il serait également intéressant d'aller regarder si les cibles S-nitrosylées dépendent du type d'exercice effectué. De telles informations sont très peu documentées dans la littérature scientifique. En effet, la S-nitrosylation dans une cellule est régulée par différents autres facteurs qui peuvent aussi être impactés plus ou moins par les conditions d'exercice physique. Ainsi il semblerait pertinent d'évaluer l'impact d'autres éléments tels que : **(1) le statut antioxydant**. En effet, des données suggèrent que des niveaux élevés d'antioxydants pourraient empêcher la S-nitrosylation, alors qu'une diminution des antioxydants favorise la S-nitrosylation (Beltrán et al., 2000; Butzer et al., 1999). **(2) La dénitrosylation**. En effet, le niveau de S-nitrosylation dans la cellule est contrôlé par un équilibre entre S-nitrosylation et dénitrosylation. Comme on a pu le montrer dans notre étude,

l'inhibition de la GSNOR (enzyme dénitrrosylante), par du N6022 induit une augmentation de la S-nitrosylation. A ce jour, l'impact de l'exercice physique sur la GSNOR est inconnu ; **(3) la présence d'inhibiteurs endogène des NOS, qui peut aussi en impactant l'activité des NOS** modifier les niveaux de S-nitrosylation.

Enfin, l'exercice physique semble être capable d'impacter l'homéostasie calcique mitochondriale en permettant une plus grande entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie sans activation du mPTP. Ce phénomène pourrait jouer un rôle majeur dans la capacité des mitochondries à répondre à l'exercice et à s'adapter à une situation de stress. Les mécanismes sous-jacents de ce phénomène semblent pouvoir avoir un intérêt majeur dans la meilleure compréhension de l'adaptation physiologique et cellulaire à l'exercice.

# REFERENCES

## ~ A ~

Adameova, A., Goncalvesova, E., Szobi, A., and Dhalla, N.S. (2016). Necroptotic cell death in failing heart: relevance and proposed mechanisms. *Heart Fail. Rev.* *21*, 213–221.

Adameova, A., Hrdlicka, J., Szobi, A., Farkasova, V., Kopaskova, K., Murarikova, M., Neckar, J., Kolar, F., Ravingerova, T., and Dhalla, N.S. (2017). Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insults. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *95*, 1163–1169.

Adlam, V.J., Harrison, J.C., Porteous, C.M., James, A.M., Smith, R.A.J., Murphy, M.P., and Sammut, I.A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* *19*, 1088–1095.

Allen, D.G., and Orchard, C.H. (1987). Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ. Res.* *60*, 153–168.

Allen, D.G., and Xiao, X.-H. (2003). Role of the cardiac Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc. Res.* *57*, 934–941.

Amanakis, G., and Murphy, E. (2020). Cyclophilin D: An Integrator of Mitochondrial Function. *Front. Physiol.* *11*.

Amanakis, G., Sun, J., Boylston, J., and Murphy, E. (2017). Cardioprotection in mice with a knock-in mutation in Cyclophilin D (CypD-C202S): a site of S-nitrosylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *112*, 140.

Amanakis, G., Sun, J., Fergusson, M.M., McGinty, S., Liu, C., Molkenkin, J.D., and Murphy, E. Cysteine 202 of cyclophilin D is a site of multiple post-translational modifications and plays a role in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.*

Andersson, D.C., Fauconnier, J., Yamada, T., Lacampagne, A., Zhang, S.-J., Katz, A., and Westerblad, H. (2011). Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.* *589*, 1791–1801.

Andreadou, I., Schulz, R., Papapetropoulos, A., Turan, B., Ytrehus, K., Ferdinandy, P., Daiber, A., and Di Lisa, F. (2020). The role of mitochondrial reactive oxygen species, NO and H<sub>2</sub>S in ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection. *J. Cell. Mol. Med.* *24*, 6510–6522.

Andrienko, T.N., Picht, E., and Bers, D.M. (2009). Mitochondrial Free Calcium Regulation during Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release in Rat Cardiac Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *46*, 1027–1036.

Antonenko, Y.N., Roginsky, V.A., Pashkovskaya, A.A., Rokitskaya, T.I., Kotova, E.A., Zaspas, A.A., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2008). Protective effects of mitochondria-targeted antioxidant SkQ in aqueous and lipid membrane environments. *J. Membr. Biol.* *222*, 141–149.

## ~ B ~

Bakeeva, L.E., Barskov, I.V., Egorov, M.V., Isaev, N.K., Kapelko, V.I., Kazachenko, A.V., Kirpatovsky, V.I., Kozlovsky, S.V., Lakomkin, V.L., Levina, S.B., et al. (2008). Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 2. Treatment of some ROS- and age-related diseases (heart arrhythmia, heart infarctions, kidney ischemia, and stroke). *Biochem. Biokhimiia* 73, 1288–1299.

Bakker, H.D., Scholte, H.R., Van den Bogert, C., Ruitenbeek, W., Jeneson, J.A., Wanders, R.J., Abeling, N.G., Dorland, B., Sengers, R.C., and Van Gennip, A.H. (1993). Deficiency of the adenine nucleotide translocator in muscle of a patient with myopathy and lactic acidosis: a new mitochondrial defect. *Pediatr. Res.* 33, 412–417.

Bassani, J.W., Bassani, R.A., and Bers, D.M. (1993). Ca<sup>2+</sup> cycling between sarcoplasmic reticulum and mitochondria in rabbit cardiac myocytes. *J. Physiol.* 460, 603–621.

Bates, T.E., Loesch, A., Burnstock, G., and Clark, J.B. (1996). Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 40–44.

Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341–345.

Becker, L.B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.* 61, 461–470.

Beltrán, B., Orsi, A., Clementi, E., and Moncada, S. (2000). Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br. J. Pharmacol.* 129, 953.

Bernardi, P., and Di Lisa, F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 100–106.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198–205.

Bibli, S.-I., Papapetropoulos, A., Iliodromitis, E.K., Daiber, A., Randriamboavonjy, V., Steven, S., Brouckaert, P., Chatzianastasiou, A., Kypreos, K.E., Hausenloy, D.J., et al. (2019). Nitroglycerine limits infarct size through S-nitrosation of cyclophilin D: a novel mechanism for an old drug. *Cardiovasc. Res.* 115, 625–636.

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

Birk, A.V., Liu, S., Soong, Y., Mills, W., Singh, P., Warren, J.D., Seshan, S.V., Pardee, J.D., and Szeto, H.H. (2013). The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 1250–1261.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L.L., Simonetti, R.G., and Glud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297, 842–857.

- Bjørklund, G., and Chirumbolo, S. (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 33, 311–321.
- Block, K., Gorin, Y., and Abboud, H.E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14385–14390.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 725–731.
- Boengler, K., Stahlhofen, S., van de Sand, A., Gres, P., Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Heusch, G., and Schulz, R. (2009). Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res. Cardiol.* 104, 141–147.
- Boengler, K., Ruiz-Meana, M., Gent, S., Ungefug, E., Soetkamp, D., Miro-Casas, E., Cabestrero, A., Fernandez-Sanz, C., Semenzato, M., Lisa, F.D., et al. (2012). Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 1649–1655.
- Bolli, R. (1995). Common methodological problems and artifacts associated with studies of myocardial stunning in vivo.
- Bolli, R., and Marbán, E. (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 79, 609–634.
- Borutaite, V., and Brown, G.C. (2006). S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1757, 562–566.
- Boulghobra, D., Coste, F., Geny, B., and Reboul, C. (2020a). Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* 152, 395–410.
- Boulghobra, D., Grillet, P.-E., Laguerre, M., Tenon, M., Fauconnier, J., Faça-Berthon, P., Reboul, C., and Cazorla, O. (2020b). Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes. *Redox Biol.* 34, 101554.
- Boveris, A., D'Amico, G., Lores-Arnaiz, S., and Costa, L.E. (2003). Enalapril increases mitochondrial nitric oxide synthase activity in heart and liver. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 691–697.
- Boyman, L., Williams, G.S.B., Khananshvil, D., Sekler, I., and Lederer, W.J. (2013). NCLX: the mitochondrial sodium calcium exchanger. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 59, 205–213.
- Boyman, L., Chikando, A.C., Williams, G.S.B., Khairallah, R.J., Kettlewell, S., Ward, C.W., Smith, G.L., Kao, J.P.Y., and Lederer, W.J. (2014). Calcium Movement in Cardiac Mitochondria. *Biophys. J.* 107, 1289–1301.
- Braunwald, E. (2011). Clinical efforts to reduce myocardial infarct size--the next step. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 16, 349–353.
- Braunwald, E., and Kloner, R.A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66, 1146–1149.
- Braunwald, E., and Kloner, R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J. Clin. Invest.* 76, 1713–1719.

de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.

Broome, S.C., Woodhead, J.S.T., and Merry, T.L. (2018). Mitochondria-Targeted Antioxidants and Skeletal Muscle Function. *Antioxidants* 7.

Buntinas, L., Gunter, K.K., Sparagna, G.C., and Gunter, T.E. (2001). The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 248–261.

Burwell, L.S., and Brookes, P.S. (2007). Mitochondria as a Target for the Cardioprotective Effects of Nitric Oxide in Ischemia–Reperfusion Injury. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 579–600.

Burwell, L.S., Nadtochiy, S.M., Tompkins, A.J., Young, S., and Brookes, P.S. (2006). Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem. J.* 394, 627–634.

Butzer, U., Weidenbach, H., Gansauge, S., Gansauge, F., Beger, H.G., and Nussler, A.K. (1999). Increased oxidative stress in the RAW 264.7 macrophage cell line is partially mediated via the S-nitrosothiol-induced inhibition of glutathione reductase. *FEBS Lett.* 445, 274–278.

~ C ~

Cadenas, S. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 117, 76–89.

Calvert John W., Condit Marah E., Aragón Juan Pablo, Nicholson Chad K., Moody Bridgette F., Hood Rebecca L., Sindler Amy L., Gundewar Susheel, Seals Douglas R., Barouch Lili A., et al. (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.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2008). Studies of thermogenesis and mitochondrial function in adipose tissues. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 456, 109–121.

Canton, M., Skyschally, A., Menabò, R., Boengler, K., Gres, P., Schulz, R., Haude, M., Erbel, R., Di Lisa, F., and Heusch, G. (2006). Oxidative modification of tropomyosin and myocardial dysfunction following coronary microembolization. *Eur. Heart J.* 27, 875–881.

Carvalho, P.C., Yates, J.R., and Barbosa, V.C. (2012). Improving the TFC test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28, 1652–1654.

Casin, K.M., Fallica, J., Mackowski, N., Veenema, R.J., Chan, A., St. Paul, A., Zhu, G., Bedja, D., Biswal, S., and Kohr, M.J. (2018). S-Nitrosoglutathione Reductase Is Essential for Protecting the Female Heart from Ischemia-Reperfusion Injury. *Circ. Res.* 123, 1232–1243.

Cave, A.C., Brewer, A.C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D.J., Walker, S., and Shah, A.M. (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 691–728.

Cazorla, O., Szilagy, S., Le Guennec, J.-Y., Vassort, G., and Lacampagne, A. (2005). Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J.* 19, 88–90.

- Chang, A.H.K., Sancheti, H., Garcia, J., Kaplowitz, N., Cadenas, E., and Han, D. (2014). Respiratory Substrates Regulate S-Nitrosylation of Mitochondrial Proteins through a Thiol-Dependent Pathway. *Chem. Res. Toxicol.* *27*, 794–804.
- Chen, C. (2016). Sinapic Acid and Its Derivatives as Medicine in Oxidative Stress-Induced Diseases and Aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 1–10.
- Chen, Y.-R., and Zweier, J.L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ. Res.* *114*, 524–537.
- Chen, H., Song, Y.S., and Chan, P.H. (2009). Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *29*, 1262–1272.
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2006). Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*
- Chen, W., Gabel, S., Steenbergen, C., and Murphy, E. (1995). A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ. Res.* *77*, 424–429.
- Chen, Y., Csordás, G., Jowdy, C., Schneider, T.G., Csordás, N., Wang, W., Liu, Y., Kohlhaas, M., Meiser, M., Bergem, S., et al. (2012). Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca<sup>2+</sup> crosstalk. *Circ. Res.* *111*, 863–875.
- Chen, Y.-R., Chen, C.-L., Pfeiffer, D.R., and Zweier, J.L. (2007). Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation. *J. Biol. Chem.* *282*, 32640–32654.
- Chiong, M., Wang, Z.V., Pedrozo, Z., Cao, D.J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J.A., and Lavandero, S. (2011). Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death Dis.* *2*, e244.
- Chou, H., Chen, Y., Lee, T., Wu, F., Chan, H., Lyu, P., Timms, J., and Chan, H. (2010). Proteomics study of oxidative stress and Src kinase inhibition in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment.
- Chouchani, E.T., Methner, C., Nadochiy, S.M., Logan, A., Pell, V.R., Ding, S., James, A.M., Cochemé, H.M., Reinhold, J., Lilley, K.S., et al. (2013). Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat. Med.* *19*, 753–759.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., James, A.M., Work, L.M., Saeb-Parsy, K., Frezza, C., Krieg, T., and Murphy, M.P. (2016). A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.* *23*, 254–263.
- Chouchani, E.T., James, A.M., Methner, C., Pell, V.R., Prime, T.A., Erickson, B.K., Forkink, M., Lau, G.Y., Bright, T.P., Menger, K.E., et al. (2017). Identification and quantification of protein S-nitrosation by nitrite in the mouse heart during ischemia. *J. Biol. Chem.* *292*, 14486–14495.
- Christie-Oleza, J.A., Piña-Villalonga, J.M., Bosch, R., Nogales, B., and Armengaud, J. (2012). Comparative Proteogenomics of Twelve *Roseobacter* Exoproteomes Reveals Different Adaptive Strategies Among These Marine Bacteria. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *11*.

Cooper, C.E., and Brown, G.C. (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J. Bioenerg. Biomembr.* *40*, 533–539.

Copeland, D.E., and Dalton, A.J. (1959). An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *5*, 393–396.

Corr, P.B., and Witkowski, F.X. (1983). Potential electrophysiologic mechanisms responsible for dysrhythmias associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* *68*, 116-24.

Costa, A.D.T., Pierre, S.V., Cohen, M.V., Downey, J.M., and Garlid, K.D. (2008). cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *77*, 344–352.

Costa, N.J., Dahm, C.C., Hurrell, F., Taylor, E.R., and Murphy, M.P. (2003). Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxid. Redox Signal.* *5*, 291–305.

Costa Alexandre D.T., Garlid Keith D., West Ian C., Lincoln Thomas M., Downey James M., Cohen Michael V., and Critz Stuart D. (2005). Protein Kinase G Transmits the Cardioprotective Signal From Cytosol to Mitochondria. *Circ. Res.* *97*, 329–336.

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

Crompton, M., Ellinger, H., and Costi, A. (1988). Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* *255*, 357.

Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., and Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* *107*, 526–545.

Crow, M.T., Mani, K., Nam, Y.-J., and Kitsis, R.N. (2004). The Mitochondrial Death Pathway and Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circ. Res.* *95*, 957–970.

Csordás, G., Golenár, T., Seifert, E.L., Kamer, K.J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., Perez, S. de la F., Bogorad, R., et al. (2013). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter. *Cell Metab.* *17*, 976–987.

Cung, T.-T., Morel, O., Cayla, G., Rioufol, G., Garcia-Dorado, D., Angoulvant, D., Bonnefoy-Cudraz, E., Guérin, P., Elbaz, M., Delarche, N., et al. (2015). Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* *373*, 1021–1031.

Cuong, D.V., Kim, N., Youm, J.B., Joo, H., Warda, M., Lee, J.-W., Park, W.S., Kim, T., Kang, S., Kim, H., et al. (2006). Nitric oxide-cGMP-protein kinase G signaling pathway induces anoxic preconditioning through activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *290*, H1808-1817.

## ~ D ~

Davidson, S.M., Adameová, A., Barile, L., Cabrera-Fuentes, H.A., Lazou, A., Pagliaro, P., Stensløkken, K.-O., Garcia-Dorado, D., and EU-CARDIOPROTECTION COST Action (CA16225) (2020). Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury. *J. Cell. Mol. Med.* *24*, 3795–3806.

- De la Fuente, S., and Sheu, S.-S. (2019). SR-mitochondria communication in adult cardiomyocytes: A close relationship where the Ca<sup>2+</sup> has a lot to say. *Arch. Biochem. Biophys.* *663*, 259–268.
- De Luca Giuseppe, Suryapranata Harry, Ottervanger Jan Paul, and Antman Elliott M. (2004). Time Delay to Treatment and Mortality in Primary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction. *Circulation* *109*, 1223–1225.
- De Marchi, E., Bonora, M., Giorgi, C., and Pinton, P. (2014). The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux. *Cell Calcium* *56*, 1–13.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* *476*, 336–340.
- De Stefani, D., Bononi, A., Romagnoli, A., Messina, A., De Pinto, V., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2012). VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca<sup>2+</sup> signals to mitochondria. *Cell Death Differ.* *19*, 267–273.
- De Stefani, D., Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2016). Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu. Rev. Biochem.* *85*, 161–192.
- Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. (2009a). Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J. Physiol.* *587*, 851–872.
- Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. (2009b). Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J. Physiol.* *587*, 851–872.
- Dedkova, E.N., and Blatter, L.A. (2013). Calcium signaling in cardiac mitochondria. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *58*, 125–133.
- Denuc, A., Núñez, E., Calvo, E., Loureiro, M., Miro-Casas, E., Guarás, A., Vázquez, J., and Garcia-Dorado, D. (2016). New protein–protein interactions of mitochondrial connexin 43 in mouse heart. *J. Cell. Mol. Med.* *20*, 794–803.
- Dey, S., DeMazumder, D., Sidor, A., Foster, D.B., and O’Rourke, B. (2018). Mitochondrial ROS Drive Sudden Cardiac Death and Chronic Proteome Remodeling in Heart Failure. *Circ. Res.* *123*, 356–371.
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 1289–1301.
- Dikalova, A.E., Bikineyeva, A.T., Budzyn, K., Nazarewicz, R.R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D.G., and Dikalov, S.I. (2010). Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension. *Circ. Res.* *107*, 106–116.
- Done, A.J., and Traustadóttir, T. (2016). Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol.* *10*, 191–199.
- Donoso, P., Sanchez, G., Bull, R., and Hidalgo, C. (2011). Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *16*, 553–567.
- Doulias, P.-T., Tenopoulou, M., Greene, J.L., Raju, K., and Ischiropoulos, H. (2013). Nitric Oxide Regulates Mitochondrial Fatty Acid Metabolism through Reversible Protein S-Nitrosylation \*\*. *Sci. Signal.* *6*, rs1.

Duranski, M.R., Greer, J.J.M., Dejam, A., Jaganmohan, S., Hogg, N., Langston, W., Patel, R.P., Yet, S.-F., Wang, X., Kevil, C.G., et al. (2005). Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J. Clin. Invest.* *115*, 1232–1240.

## ~ E ~

Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., Pannekoek, W.J., Liu, W.M., Cramer, M.J., Lips, D.J., and Doevendans, P.A. (2004). Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *61*, 414–426.

Eisner, V., Csordás, G., and Hajnóczky, G. (2013). Interactions between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria in cardiac and skeletal muscle - pivotal roles in Ca<sup>2+</sup> and reactive oxygen species signaling. *J. Cell Sci.* *126*, 2965–2978.

Ejlersen, H., Andersen, Z.J., von Euler-Chelpin, M.C., Johansen, P.P., Schnohr, P., and Prescott, E. (2017a). Prognostic impact of physical activity prior to myocardial infarction: Case fatality and subsequent risk of heart failure and death. *Eur. J. Prev. Cardiol.* *24*, 1112–1119.

Ejlersen, H., Andersen, Z.J., von Euler-Chelpin, M.C., Johansen, P.P., Schnohr, P., and Prescott, E. (2017b). Prognostic impact of physical activity prior to myocardial infarction: Case fatality and subsequent risk of heart failure and death. *Eur. J. Prev. Cardiol.* *24*, 1112–1119.

Elfering, S.L., Sarkela, T.M., and Giulivi, C. (2002). Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* *277*, 38079–38086.

Elrod, J.W., Wong, R., Mishra, S., Vagnozzi, R.J., Sakthivel, B., Goonasekera, S.A., Karch, J., Gabel, S., Farber, J., Force, T., et al. (2010). Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca<sup>2+</sup> exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 3680–3687.

Erusalimsky, J.D., and Moncada, S. (2007). Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 2524–2531.

## ~ F ~

Farah, C., and Reboul, C. (2015). NO Better Way to Protect the Heart during Ischemia–Reperfusion: To be in the Right Place at the Right Time. *Front. Pediatr.* *3*.

Farah, C., Meyer, G., André, L., Boissière, J., Gayrard, S., Cazorla, O., Richard, S., Boucher, F., Tanguy, S., Obert, P., et al. (2010). Moderate exercise prevents impaired Ca<sup>2+</sup> handling in heart of CO-exposed rat: implication for sensitivity to ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *299*, H2076–2081.

Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Geny, B., Obert, P., Cazorla, O., Tanguy, S., and Reboul, C. (2013). Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res. Cardiol.* *108*, 389.

Farah, C., Nascimento, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Lacampagne, A., Cazorla, O., and Reboul, C. (2017). Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *102*, 26–30.

Fauconnier, J., Andersson, D.C., Zhang, S.-J., Lanner, J.T., Wibom, R., Katz, A., Bruton, J.D., and Westerblad, H. (2007). Effects of Palmitate on Ca<sup>2+</sup> Handling in Adult Control and ob/ob Cardiomyocytes : Impact of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Diabetes* 56, 1136–1142.

Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., Marks, A.R., and Lacampagne, A. (2010). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1559.

Ferdinandy, P., and Schulz, R. (2003). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br. J. Pharmacol.* 138, 532–543.

Feron, O., and Balligand, J.-L. (2006). Caveolins and the regulation of endothelial nitric oxide synthase in the heart. *Cardiovasc. Res.* 69, 788–797.

Feron, O., Saldana, F., Michel, J., and Michel, T. (1998). The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle.

Fleming, I., and Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase.

Fliss, H., and Gattinger, D. (1996). Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.* 79, 949–956.

Forbes, R., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2001). Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism.

Frantz, M.-C., and Wipf, P. (2010). Mitochondria as a target in treatment. *Environ. Mol. Mutagen.* 51, 462–475.

French, J.P., Hamilton, K.L., Quindry, J.C., Lee, Y., Upchurch, P.A., and Powers, S.K. (2008). Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 2862–2871.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.

~ G ~

Gao, D., Yang, J., Wu, Y., Wang, Q., Wang, Q., Lai, E.Y., and Zhu, J. (2016). Targeting Dynamin 2 as a Novel Pathway to Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis Following Oxidative Stress. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 39, 2121–2134.

Gao, S., Chen, J., Brodsky, S.V., Huang, H., Adler, S., Lee, J.H., Dhadwal, N., Cohen-Gould, L., Gross, S.S., and Goligorsky, M.S. (2004). Docking of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) to the Mitochondrial Outer Membrane A PENTABASIC AMINO ACID SEQUENCE IN THE AUTOINHIBITORY DOMAIN OF eNOS TARGETS A PROTEINASE K-CLEAVABLE PEPTIDE ON THE CYTOPLASMIC FACE OF MITOCHONDRIA. *J. Biol. Chem.* 279, 15968–15974.

Gao, W.D., Atar, D., Backx, P.H., and Marban, E. (1995). Relationship Between Intracellular Calcium and Contractile Force in Stunned Myocardium: Direct Evidence for Decreased Myofilament Ca<sup>2+</sup> Responsiveness and Altered Diastolic Function in Intact Ventricular Muscle. *Circ. Res.* 76, 1036–1048.

- García-Dorado, D., Agulló, L., Sartorio, C.L., and Ruiz-Meana, M. (2009). Myocardial protection against reperfusion injury: the cGMP pathway. *Thromb. Haemost.* *101*, 635–642.
- García-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Rodríguez-Sinovas, A., and Piper, H.M. (2012). Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc. Res.* *94*, 168–180.
- García-Niño, W.R., Correa, F., Rodríguez-Barrena, J.I., León-Contreras, J.C., Buelna-Chontal, M., Soria-Castro, E., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverri, J., and Zazueta, C. (2017a). Cardioprotective kinase signaling to subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria is mediated by caveolar structures. *Basic Res. Cardiol.* *112*, 15.
- García-Niño, W.R., Correa, F., Rodríguez-Barrena, J.I., León-Contreras, J.C., Buelna-Chontal, M., Soria-Castro, E., Hernández-Pando, R., Pedraza-Chaverri, J., and Zazueta, C. (2017b). Cardioprotective kinase signaling to subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria is mediated by caveolar structures. *Basic Res. Cardiol.* *112*, 15.
- Giacomello, M., and Pellegrini, L. (2016). The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* *23*, 1417–1427.
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., et al. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5887–5892.
- Glancy, B., and Balaban, R.S. (2012). Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry (Mosc.)* *51*, 2959–2973.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 37–43.
- Gonzales, G.F., Chung, F.A., Miranda, S., Valdez, L.B., Zaobornyj, T., Bustamante, J., and Boveris, A. (2005). Heart mitochondrial nitric oxide synthase is upregulated in male rats exposed to high altitude (4,340 m). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *288*, H2568-2573.
- Gonzalez, D., Treuer, A., Castellanos, J., Dulce, R., and Hare, J. (2010). Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure.
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., and Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* *6*, 260–271.
- Gottlieb, R.A., and Mentzer, R.M. (2010). Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 45–59.
- Griendling, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* *86*, 494–501.
- Griffiths, E.J., and Halestrap, A.P. (1993). Protection by Cyclosporin A of Ischemia/Reperfusion-Induced Damage in Isolated Rat Hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *25*, 1461–1469.
- Griffiths, E.J., and Rutter, G.A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1787*, 1324–1333.

Griffiths, E.J., Ocampo, C.J., Savage, J.S., Rutter, G.A., Hansford, R.G., Stern, M.D., and Silverman, H.S. (1998). Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* *39*, 423–433.

Grover, G.J., Atwal, K.S., Sleph, P.G., Wang, F.-L., Monshizadegan, H., Monticello, T., and Green, D.W. (2004). Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *287*, H1747-1755.

Guan, L., Che, Z., Meng, X., Yu, Y., Li, M., Yu, Z., Shi, H., Yang, D., and Yu, M. (2019). MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion Injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy Inhibition. *J. Cell. Mol. Med.* *23*, 7830–7843.

van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *304*, 487–497.

Gustafsson, A.B., and Gottlieb, R.A. (2009). Autophagy in ischemic heart disease. *Circ. Res.* *104*, 150–158.

## ~ H ~

Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Javadov, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* *61*, 372–385.

Hamilton, K.L., Powers, S.K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N., and 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*, H1346-1352.

Hamilton, K.L., Staib, J.L., Phillips, T., Hess, A., Lennon, S.L., and Powers, S.K. (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* *34*, 800–809.

Hansford, R.G., Hogue, B.A., and Mildaziene, V. (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* *29*, 89–95.

Hare, J.M. (2003). Nitric oxide and excitation–contraction coupling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *35*, 719–729.

Hausenloy, D., and Yellon, D. (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway.

Heinzel, F.R., Luo, Y., Li, X., Boengler, K., Buechert, A., García-Dorado, D., Di Lisa, F., Schulz, R., and Heusch, G. (2005). Impairment of diazoxide-induced formation of reactive oxygen species and loss of cardioprotection in connexin 43 deficient mice. *Circ. Res.* *97*, 583–586.

Heiss, E.H., and Dirsch, V.M. (2014). Regulation of eNOS Enzyme Activity by Posttranslational Modification. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 3503–3513.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Nudelman, R., and Stamler, J.S. (2001). S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat. Cell Biol.* *3*, E46-49.

Hoerter, J., Gonzalez-Barroso, M.-M., Couplan, E., Mateo, P., Gelly, C., Cassard-Doulcier, A.-M., Diolez, P., and Bouillaud, F. (2004). Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation* 110, 528–533.

Holmuhamedov, E.L., Oberlin, A., Short, K., Terzic, A., and Jahangir, A. (2012). Cardiac subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct responsiveness to protection by diazoxide. *PLoS One* 7, e44667.

Hom, J., and Sheu, S.-S. (2009). Morphological dynamics of mitochondria — A special emphasis on cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 811–820.

Hou, H., Wang, Y., Li, Q., Li, Z., Teng, Y., Li, J., Wang, X., Chen, J., and Huang, N. (2018). The role of RIP3 in cardiomyocyte necrosis induced by mitochondrial damage of myocardial ischemia-reperfusion. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 50, 1131–1140.

Hou, T., Zhang, X., Xu, J., Jian, C., Huang, Z., Ye, T., Hu, K., Zheng, M., Gao, F., Wang, X., et al. (2013). Synergistic triggering of superoxide flashes by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport and basal reactive oxygen species elevation. *J. Biol. Chem.* 288, 4602–4612.

Huang, Z., Zhang, W., Gong, G., Fang, H., Zheng, M., Wang, X., Xu, J., Dirksen, R.T., Sheu, S.-S., Cheng, H., et al. (2011). Response to “A critical evaluation of cpYFP as a probe for superoxide.” *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1937–1940.

Hung, L.M., Chen, J.K., Huang, S.S., Lee, R.S., and Su, M.J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc. Res.* 47, 549–555.

Hunter, D.J., and Reddy, K.S. (2013). Noncommunicable Diseases. *N. Engl. J. Med.* 369, 1336–1343.

Hunter, D.R., and Haworth, R.A. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 453–459.

Huo, J., Lu, S., Kwong, J., Brund, M., Grimes, K., Sargent, M., Brown, M., Davis, M., Bers, D., and Molkentin, J. (2020). MCUB Induction Protects the Heart From Postischemic Remodeling.

~ I ~

Ideker, R.E., Klein, G.J., Harrison, L., Smith, W.M., Kasell, J., Reimer, K.A., Wallace, A.G., and Gallagher, J.J. (1981). The transition to ventricular fibrillation induced by reperfusion after acute ischemia in the dog: a period of organized epicardial activation. *Circulation* 63, 1371–1379.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 9265–9269.

Ignarro, L.J., Balestrieri, M.L., and Napoli, C. (2007). Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc. Res.* 73, 326–340.

Inserte, J., and Garcia-Dorado, D. (2015). The cGMP/PKG pathway as a common mediator of cardioprotection: translatability and mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1996–2009.

Inserte, J., Hernando, V., and Garcia-Dorado, D. (2012). Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *96*, 23–31.

Irie, T., Sips, P.Y., Kai, S., Kida, K., Ikeda, K., Hirai, S., Moazzami, K., Jiramongkolchai, P., Bloch, D.B., Doulias, P.-T., et al. (2015). S-Nitrosylation of Calcium-Handling Proteins in Cardiac Adrenergic Signaling and Hypertrophy. *Circ. Res.* *117*, 793–803.

Ivanov, F., Mewton, N., Rioufol, G., Piot, C., Elbaz, M., Revel, D., Croisille, P., and Ovize, M. (2010). Cardioprotection in the clinical setting. *Cardiovasc. Drugs Ther.* *24*, 281–287.

Jaffrey, S.R., and Snyder, S.H. (2001). The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Sci. STKE* *2001*, p11-p11.

## ~ J ~

James, A.M., Cochemé, H.M., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (2005). Interactions of Mitochondria-targeted and Untargeted Ubiquinones with the Mitochondrial Respiratory Chain and Reactive Oxygen Species IMPLICATIONS FOR THE USE OF EXOGENOUS UBIQUINONES AS THERAPIES AND EXPERIMENTAL TOOLS. *J. Biol. Chem.* *280*, 21295–21312.

Jennings, R., and Ganote, C. (1976). Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury.

Jennings, R.B., and Reimer, K.A. (1983). Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* *68*, 125-36.

Jennings, R.B., Sommers, H.M., Smyth, G.A., Flack, H.A., and Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* *70*, 68–78.

Jiang, J., Yuan, X., Wang, T., Chen, H., Zhao, H., Yan, X., Wang, Z., Sun, X., and Zheng, Q. (2014). Antioxidative and cardioprotective effects of total flavonoids extracted from *Dracocephalum moldavica* L. against acute ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in isolated rat heart. *Cardiovasc. Toxicol.* *14*, 74–82.

Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J.C., and MacDonald, M.J. (2010). Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* *53*, 1019–1032.

Joiner, M.-L.A., Koval, O.M., Li, J., He, B.J., Allamargot, C., Gao, Z., Luczak, E.D., Hall, D.D., Fink, B.D., Chen, B., et al. (2012). CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature* *491*, 269–273.

Jolly, S.R., Kane, W.J., Bailie, M.B., Abrams, G.D., and Lucchesi, B.R. (1984). Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ. Res.* *54*, 277–285.

## ~ K ~

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., and Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1–6.

Kanai, A.J., Pearce, L.L., Clemens, P.R., Birder, L.A., VanBibber, M.M., Choi, S.-Y., Groat, W.C. de, and Peterson, J. (2001). Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14126–14131.

Kelso, G.F., Porteous, C.M., Coulter, C.V., Hughes, G., Porteous, W.K., Ledgerwood, E.C., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2001). Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.* 276, 4588–4596.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

Kinnally, K.W., Peixoto, P.M., Ryu, S.-Y., and Dejean, L.M. (2011). Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 616–622.

Klein, G., Mathé, C., Biola-Clier, M., Devineau, S., Drouineau, E., Hatem, E., Marichal, L., Alonso, B., Gaillard, J., Lagniel, G., et al. (2016). RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts.

Kleindienst, A., Battault, S., Belaidi, E., Tanguy, S., Rosselin, M., Boulghobra, D., Meyer, G., Gayrard, S., Walther, G., Geny, B., et al. (2016). Exercise does not activate the  $\beta$ 3 adrenergic receptor–eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res. Cardiol.* 111, 40.

Kloner, R.A., and Jennings, R.B. (2001). Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 104, 3158–3167.

Kloner, R.A., Ganote, C.E., and Jennings, R.B. (1974). The “No-Reflow” Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog. *J. Clin. Invest.* 54, 1496–1508.

Knekt, P., Ritz, J., Pereira, M.A., O’Reilly, E.J., Augustsson, K., Fraser, G.E., Goldbourt, U., Heitmann, B.L., Hallmans, G., Liu, S., et al. (2004). Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1508–1520.

Ko, Y.H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W., and Pedersen, P.L. (2003). Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* 278, 12305–12309.

Kobzik, L., Stringer, B., Balligand, J.L., Reid, M.B., and Stamler, J.S. (1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 375–381.

Kohr, M., Aponte, A., J, S., Gucek, M., Steenbergen, C., and E, M. (2012). Measurement of S-nitrosylation occupancy in the myocardium with cysteine-reactive tandem mass tags: short communication.

Kohr, M.J., Aponte, A.M., Sun, J., Wang, G., Murphy, E., Gucek, M., and Steenbergen, C. (2011a). Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *300*, H1327-1335.

Kohr, M.J., Sun, J., Aponte, A., Wang, G., Gucek, M., Murphy, E., and Steenbergen, C. (2011b). Simultaneous Measurement of Protein Oxidation and S-nitrosylation during Preconditioning and Ischemia-Reperfusion Injury with Resin-Assisted Capture. *Circ. Res.* *108*, 418–426.

Korge, P., Yang, L., Yang, J.-H., Wang, Y., Qu, Z., and Weiss, J.N. (2011). Protective Role of Transient Pore Openings in Calcium Handling by Cardiac Mitochondria. *J. Biol. Chem.* *286*, 34851–34857.

Koshinuma, S., Miyamae, M., Kaneda, K., Kotani, J., and Figueredo, V.M. (2014). Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Anesth.* *28*, 235–241.

Kuznetsov, A.V., and Margreiter, R. (2009a). Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 1911–1929.

Kuznetsov, A.V., and Margreiter, R. (2009b). Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity. *Int. J. Mol. Sci.* *10*, 1911–1929.

Kuznetsov, A.V., Javadov, S., Margreiter, R., Grimm, M., Hagenbuchner, J., and Ausserlechner, M.J. (2019). The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants* *8*.

Kwong, J.Q., and Molkenin, J.D. (2015). Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metab.* *21*, 206–214.

## ~ L ~

Lacerda, L., Somers, S., Opie, L.H., and Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc. Res.* *84*, 201–208.

Lacza, Z., Snipes, J., Zhang, J., Horváth, E., Figueroa, J., Szabó, C., and Busija, D. (2003). Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS.

Lacza, Z., Pankotai, E., and Busija, D.W. (2009). Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *14*, 4436–4443.

Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Baréa, B., Cambon, E., Tchobo, P.F., Barouh, N., and Villeneuve, P. (2008). Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. *Anal. Biochem.* *380*, 282–290.

Lang, J.K., Gohil, K., and Packer, L. (1986). Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* *157*, 106–116.

Lauridsen, C., and Jensen, S.K. (2012).  $\alpha$ -Tocopherol incorporation in mitochondria and microsomes upon supranutritional vitamin E supplementation. *Genes Nutr.* *7*, 475–482.

- Layland, J., Li, J.-M., and 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*, 457–467.
- Lebuffe, G., Schumacker, P.T., Shao, Z.-H., Anderson, T., Iwase, H., and Vanden Hoek, T.L. (2003). ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *284*, H299-308.
- Lee, H.-L., Chen, C.-L., Yeh, S.T., Zweier, J.L., and Chen, Y.-R. (2012a). Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *302*, H1410-1422.
- Lee, Y., Min, K., Talbert, E.E., Kavazis, A.N., Smuder, A.J., Willis, W.T., and Powers, S.K. (2012b). Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* *44*, 397–405.
- Leite, A.C.R., Oliveira, H.C.F., Utino, F.L., Garcia, R., Alberici, L.C., Fernandes, M.P., Castilho, R.F., and Vercesi, A.E. (2010). Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1797*, 1210–1216.
- Lemasters, J., Theruvath, T., Zhong, Z., and Al, N. (2009). Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death.
- Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Cascio, W.E., Trost, L.C., Nishimura, Y., Nieminen, A.L., and Herman, B. (1999). Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J. Bioenerg. Biomembr.* *31*, 305–319.
- Li, K., Zhang, W., Fang, H., Xie, W., Liu, J., Zheng, M., Wang, X., Wang, W., Tan, W., and Cheng, H. (2012). Superoxide Flashes Reveal Novel Properties of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Excitability in Cardiomyocytes. *Biophys. J.* *102*, 1011–1021.
- Liberman, E.A., Topaly, V.P., Tsofina, L.M., Jasaitis, A.A., and Skulachev, V.P. (1969). Mechanism of Coupling of Oxidative Phosphorylation and the Membrane Potential of Mitochondria. *Nature* *222*, 1076–1078.
- Lim, S.Y., Davidson, S.M., Mocanu, M.M., Yellon, D.M., and Smith, C.C.T. (2007). The cardioprotective effect of necrostatin requires the cyclophilin-D component of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Drugs Ther.* *21*, 467–469.
- Lima, B., Forrester, M.T., Hess, D.T., and Stamler, J.S. (2010). S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling. *Circ. Res.* *106*, 633–646.
- Limbu, S., Hoang-Trong, T.M., Prosser, B.L., Lederer, W.J., and Jafri, M.S. (2015). Modeling Local X-ROS and Calcium Signaling in the Heart. *Biophys. J.* *109*, 2037–2050.
- Lindenmayer, G., Sordahl, L., and Schwartz, A. (1968). Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure.
- Liu, Y., and Zhang, Y. (2015). CHCHD2 connects mitochondrial metabolism to apoptosis. *Mol. Cell. Oncol.* *2*.

Liu, J., García-Cardeña, G., and Sessa, W.C. (1996). Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 13277–13281.

Luo, S., Valencia, C.A., Zhang, J., Lee, N.-C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., et al. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 13039–13044.

Luongo, T.S., Lambert, J.P., Yuan, A., Zhang, X., Gross, P., Song, J., Shanmughapriya, S., Gao, E., Jain, M., Houser, S.R., et al. (2015). The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Rep.* *12*, 23–34.

Luongo, T.S., Lambert, J.P., Gross, P., Nwokedi, M., Lombardi, A.A., Shanmughapriya, S., Carpenter, A.C., Kolmetzky, D., Gao, E., van Berlo, J.H., et al. (2017). The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *Nature* *545*, 93–97.

## ~ M ~

Ma, X., Weyrich, A., Lefer, D., and Lefer, A. (1993). Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium.

Magalhães, J., Gonçalves, I.O., Lumini-Oliveira, J., Marques-Aleixo, I., Passos, E., Rocha-Rodrigues, S., Machado, N.G., Moreira, A.C., Rizo, D., Viscor, G., et al. (2014). Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia. *Int. J. Cardiol.* *173*, 40–45.

Maguire, J.J., Kagan, V.E., and Packer, L. (1992). Electron transport between cytochrome c and alpha tocopherol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *188*, 190–197.

Mallilankaraman, K., Doonan, P., Cárdenas, C., Chandramoorthy, H.C., Muller, M., Miller, R., Hoffman, N.E., Gandhirajan, R., Molgó, J., Birnbaum, M.J., et al. (2012). MICU1 is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake That Regulates Cell Survival. *Cell* *151*, 630–644.

Maneechote, C., Palee, S., Kerdphoo, S., Jaiwongkam, T., Chattipakorn, S.C., and Chattipakorn, N. (2018). Differential temporal inhibition of mitochondrial fission by Mdivi-1 exerts effective cardioprotection in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *132*, 1669–1683.

Manning, A.S., Coltart, D.J., and Hearse, D.J. (1984). Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ. Res.* *55*, 545–548.

Marchioli, R. (2001). Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: results of GISSI-prevenzione trial. *Eur. Heart J. Suppl.* *3*, D85–D97.

Marcil, M., Bourduas, K., Ascah, A., and Burelle, Y. (2006). Exercise training induces respiratory substrate-specific decrease in Ca<sup>2+</sup>-induced permeability transition pore opening in heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *290*, H1549-1557.

Marczin, N., El-Habashi, N., Hoare, G.S., Bundy, R.E., and Yacoub, M. (2003). Antioxidants in myocardial ischemia–reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* *420*, 222–236.

- Mark, R.J., Keller, J.N., Kruman, I., and Mattson, M.P. (1997). Basic FGF attenuates amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res.* *756*, 205–214.
- Marongiu, E., and Crisafulli, A. (2014). Cardioprotection Acquired Through Exercise: The Role of Ischemic Preconditioning. *Curr. Cardiol. Rev.* *10*, 336–348.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., and Denton, R.M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* *70*, 391–425.
- McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a008656.
- McMillin-Wood, J., Wolkowicz, P.E., Chu, A., Tate, C.A., Goldstein, M.A., and Entman, M.L. (1980). Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *591*, 251–265.
- McQueen, M.J., Lonn, E., Gerstein, H.C., Bosch, J., and Yusuf, S. (2005). The HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) Study and its consequences. *Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.* *240*, 143–156.
- Meis, L., and Vianna, A.L. (1979). Energy Interconversion by the Ca<sup>2+</sup>-Dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* *48*, 275–292.
- Meissner, G. (2010). Regulation of Ryanodine Receptor Ion Channels Through Posttranslational Modifications. *Curr. Top. Membr.* *66*, 91.
- Menazza, S., Wong, R., Nguyen, T., Wang, G., Gucek, M., and Murphy, E. (2013). CypD<sup>-/-</sup> Hearts Have Altered Levels of Proteins Involved in Krebs Cycle, Branch Chain Amino Acid Degradation and Pyruvate Metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *56*, 81–90.
- Methner, C., Lukowski, R., Grube, K., Loga, F., Smith, R.A.J., Murphy, M.P., Hofmann, F., and Krieg, T. (2013). Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res. Cardiol.* *108*, 337.
- Methner, C., Chouchani, E.T., Buonincontri, G., Pell, V.R., Sawiak, S.J., Murphy, M.P., and Krieg, T. (2014). Mitochondria selective S-nitrosation by mitochondria-targeted S-nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts. *Eur. J. Heart Fail.* *16*, 712–717.
- Mewton, N., Cung, T.T., Morel, O., Cayla, G., Bonnefoy-Cudraz, E., Rioufol, G., Angoulvant, D., Guerin, P., Elbaz, M., Delarche, N., et al. (2015). Rationale and design of the Cyclosporine to Improve Clinical Outcome in ST-elevation myocardial infarction patients (the CIRCUS trial). *Am. Heart J.* *169*, 758–766.e6.
- Meziat, C., Boulghobra, D., Strock, E., Battault, S., Bornard, I., Walther, G., and Reboul, C. (2019). Exercise training restores eNOS activation in the perivascular adipose tissue of obese rats: Impact on vascular function. *Nitric Oxide* *86*, 63–67.
- Miller, E.R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R.A., Appel, L.J., and Guallar, E. (2005). Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann. Intern. Med.* *142*, 37–46.
- Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *41*, 445–502.

- Mitchell, J., Samuni, A., Krishna, M., DeGraff, W., Ahn, M., Samuni, U., and Russo, A. (1990). Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics.
- Miyamae, M., Camacho, S.A., Weiner, M.W., and Figueredo, V.M. (1996). Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of  $[Ca^{2+}]_m$  overload in rat hearts. *Am. J. Physiol.* *271*, H2145-2153.
- Mnatsakanyan, N., Beutner, G., Porter, G.A., Alavian, K.N., and Jonas, E.A. (2017). Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Bioenerg. Biomembr.* *49*, 13–25.
- Moini, H., Arroyo, A., Vaya, J., and Packer, L. (1999). Bioflavonoid effects on the mitochondrial respiratory electron transport chain and cytochrome c redox state. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* *4*, 35–41.
- Moncada, S., and Higgs, E. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance.
- Mootha, V.K., Arai, A.E., and Balaban, R.S. (1997). Maximum oxidative phosphorylation capacity of the mammalian heart. *Am. J. Physiol.* *272*, H769-775.
- Morin, D., Assaly, R., Paradis, S., and Berdeaux, A. (2009). Inhibition of mitochondrial membrane permeability as a putative pharmacological target for cardioprotection. *Curr. Med. Chem.* *16*, 4382–4398.
- Morré, D.J., Merritt, W.D., and Lembi, C.A. (1971). Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. *Protoplasma* *73*, 43–49.
- Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* *279*, 49064–49073.
- Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B., and Marbán, E. (2001). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix  $Ca^{2+}$  overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* *89*, 891–898.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* *417*, 1–13.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2007). Preconditioning: The Mitochondrial Connection. *Annu. Rev. Physiol.* *69*, 51–67.
- Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol. Rev.* *88*, 581–609.
- Murphy, M.P., and Smith, R.A. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *41*, 235–250.
- Murphy, M.P., and Smith, R.A.J. (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *47*, 629–656.
- Murphy, E., Kohr, M., Sun, J., Nguyen, T., and Steenbergen, C. (2012). S-Nitrosylation: A Radical Way to Protect the Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 568–577.
- Murphy, E., Kohr, M., Menazza, S., Nguyen, T., Evangelista, A., Sun, J., and Steenbergen, C. (2014). Signaling by S-Nitrosylation in the Heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *73*, 18–25.

Murray, C.J., and Lopez, A.D. (1997). Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *The Lancet* 349, 1269–1276.

Murry, C., Rb, J., and Ka, R. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.

## ~ N ~

Nakaya, H., Takeda, Y., Tohse, N., and Kanno, M. (1992). Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 523–534.

Napolitano, G., Fasciolo, G., Di Meo, S., and Venditti, P. (2019). Vitamin E Supplementation and Mitochondria in Experimental and Functional Hyperthyroidism: A Mini-Review. *Nutrients* 11.

Nass, M.M., and Nass, S. (1963). INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. I. FIXATION AND ELECTRON STAINING REACTIONS. *J. Cell Biol.* 19, 593–611.

Nazareth, W., Yafei, N., and Crompton, M. (1991). Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 1351–1354.

Negretti, N., O'Neill, S.C., and Eisner, D.A. (1993). The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 27, 1826–1830.

Neuzil, J., Widén, C., Gellert, N., Swettenham, E., Zabalova, R., Dong, L.-F., Wang, X.-F., Lidebjer, C., Dalen, H., Headrick, J.P., et al. (2007). Mitochondria transmit apoptosis signalling in cardiomyocyte-like cells and isolated hearts exposed to experimental ischemia-reperfusion injury. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 12, 148–162.

Nguyen, T.T., Stevens, M.V., Kohr, M., Steenbergen, C., Sack, M.N., and Murphy, E. (2011). Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 286, 40184–40192.

Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Ma, J., Fan, G.-C., Lacefield, J.C., Lu, Y., Le Tissier, S., and Peng, T. (2016a). Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic. Biol. Med.* 90, 12–23.

Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Ma, J., Fan, G.-C., Lacefield, J.C., Lu, Y., Tissier, S.L., and Peng, T. (2016b). Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radic. Biol. Med.* 90, 12–23.

Nicholls, D.G. (1978). Calcium transport and proton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem. J.* 170, 511–522.

Nishida, C.R., and Ortiz de Montellano, P.R. (1999). Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J. Biol. Chem.* 274, 14692–14698.

Nithya, R., and Subramanian, S. (2017). Antioxidant properties of sinapic acid: In vitro and in vivo approach. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 10, 255.

Nuttall, S.L., Kendall, M.J., and Martin, U. (1999). Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease. *QJM Int. J. Med.* 92, 239–244.

## ~ O ~

Olgar, Y., Degirmenci, S., Durak, A., Billur, D., Can, B., Kayki-Mutlu, G., Arioglu-Inan E, E., and Turan, B. (2018). Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Exp. Gerontol.* *110*, 172–181.

Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.H., et al. (1996). Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* *334*, 1150–1155.

Oropeza-Almazán, Y., Vázquez-Garza, E., Chapoy-Villanueva, H., Torre-Amione, G., and García-Rivas, G. (2017). Small Interfering RNA Targeting Mitochondrial Calcium Uniporter Improves Cardiomyocyte Cell Viability in Hypoxia/Reoxygenation Injury by Reducing Calcium Overload. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*, 5750897.

Ou, B., Chang, T., Huang, D., and Prior, R.L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First Action 2012.23. *J. AOAC Int.* *96*, 1372–1376.

Oyewole, A.O., and Birch-Machin, M.A. (2015). Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.* *29*, 4766–4771.

Ozcan, C., Palmeri, M., Horvath, T.L., Russell, K.S., and Russell, R.R. (2013). Role of uncoupling protein 3 in ischemia-reperfusion injury, arrhythmias, and preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *304*, H1192-1200.

## ~ P ~

Pacher, P., Js, B., and L, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.

Paige, J., Xu, G., Stancevic, B., and Jaffrey, S. (2008). Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability.

Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P.-A., Gomez, L., Fauconnier, J., Da Silva, C.C., Teixeira, G., Mewton, N., Belaidi, E., Durand, A., et al. (2013). Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* *128*, 1555–1565.

Pain, T., Yang, X., Critz, S., Yue, Y., Nakano, A., Liu, G., Heusch, G., Cohen, M., and Downey, J. (2000). Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals.

Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat. Rec.* *114*, 427–451.

Palmer, J.W., Tandler, B., and Hoppel, C.L. (1986). Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *250*, H741–H748.

Palmer, R.M., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* *333*, 664–666.

- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., et al. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 436–441.
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Allen, M., Springer, D.A., et al. (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU). *Nat. Cell Biol.* *15*, 1464–1472.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., and Ruggiero, F.M. (2004). Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ. Res.* *94*, 53–59.
- Penna, C., Perrelli, M.-G., and Pagliaro, P. (2013). Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 556–599.
- Penna, C., Angotti, C., and Pagliaro, P. (2014). Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. *Exp. Biol. Med.* *239*, 647–662.
- Petroff, M.G., Kim, S.H., Pepe, S., Dessy, C., Marbán, E., Balligand, J.L., and Sollott, S.J. (2001). Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca<sup>2+</sup> release in cardiomyocytes. *Nat. Cell Biol.* *3*, 867–873.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Di Venosa, N., and Paradies, G. (2003). Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 714–716.
- Peytz, N.C., Jabbari, R., Bojesen, S.E., Nordestgaard, B., Schnohr, P., and Prescott, E. (2019). Physical activity and risk of instant and 28-day case-fatality in myocardial infarction. *PLOS ONE* *14*, e0217398.
- Piantadosi, C.A. (2012). Regulation of Mitochondrial Processes by Protein S-Nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1820*, 712–721.
- Piot, C., Croisille, P., Staat, P., Thibault, H., Rioufol, G., Mewton, N., Elbelghiti, R., Cung, T.T., Bonnefoy, E., Angoulvant, D., et al. (2008). Effect of Cyclosporine on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* *359*, 473–481.
- Pong, T., Scherrer-Crosbie, M., Atochin, D.N., Bloch, K.D., and Huang, P.L. (2014). Phosphomimetic Modulation of eNOS Improves Myocardial Reperfusion and Mimics Cardiac Postconditioning in Mice. *PLoS ONE* *9*, e85946.
- Powers, S.K., Demirel, H.A., Vincent, H.K., Coombes, J.S., Naito, H., Hamilton, K.L., Shanely, R.A., and Jessup, J. (1998). Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *275*, R1468–R1477.
- Powers, S.K., Quindry, J.C., and Kavazis, A.N. (2008). Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 193–201.
- Prime, T.A., Blaikie, F.H., Evans, C., Nadtochiy, S.M., James, A.M., Dahm, C.C., Vitturi, D.A., Patel, R.P., Hiley, C.R., Abakumova, I., et al. (2009). A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 10764–10769.

Prosser, B.L., Ward, C.W., and Lederer, W.J. (2011). X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science* 333, 1440–1445.

Przyklenk, K., Dong, Y., Undyala, V.V., and Whittaker, P. (2012). Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc. Res.* 94, 197–205.

Puymirat, E. (2012). Association of Changes in Clinical Characteristics and Management With Improvement in Survival Among Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction. *JAMA* 308, 998.

## ~ Q ~

Qin, F., Yan, C., Patel, R., Liu, W., and Dong, E. (2006). Vitamins C and E attenuate apoptosis, beta-adrenergic receptor desensitization, and sarcoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup> ATPase downregulation after myocardial infarction.

Quinlan, C.L., Gerencser, A.A., Treberg, J.R., and Brand, M.D. (2011). The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-inhibited Mitochondrial Q-cycle. *J. Biol. Chem.* 286, 31361–31372.

## ~ R ~

Rapoport, R., Draznin, M., and Murad, F. (1983). Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation.

Rasola, A., and Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50, 222–233.

Rassaf, T., Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., Shiva, S., Heusch, G., and Kelm, M. (2014). Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 114, 1601–1610.

Rassaf Tienush, Flögel Ulrich, Drexhage Christine, Hendgen-Cotta Ulrike, Kelm Malte, and Schrader Jürgen (2007). Nitrite Reductase Function of Deoxyhemoglobin. *Circ. Res.* 100, 1749–1754.

Reboul, C., Tanguy, S., Juan, J.M., Dauzat, M., and Obert, P. (2005). Cardiac remodeling and functional adaptations consecutive to altitude training in rats: implications for sea level aerobic performance. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 98, 83–92.

Reimer, K.A., and 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. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 40, 633–644.

Reimer, K.A., Lowe, J.E., Rasmussen, M.M., and Jennings, R.B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56, 786–794.

Reiner, M., Bloch, W., and Addicks, K. (2001). Functional Interaction of Caveolin-1 and eNOS in Myocardial Capillary Endothelium Revealed by Immunoelectron Microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 1605–1609.

- Ristow, M. (2014). Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat. Med.* *20*, 709–711.
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehnopf, M., Stumvoll, M., Kahn, C.R., and Blüher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8665–8670.
- Rius, R., Cowley, M.J., Riley, L., Puttick, C., Thorburn, D.R., and Christodoulou, J. (2019). Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans is not a common phenomenon. *Genet. Med.* *21*, 2823–2826.
- Riva, A., Tandler, B., Loffredo, F., Vazquez, E., and Hoppel, C. (2005). Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *289*, H868–H872.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* *280*, 1763–1766.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., and Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J. Physiol.* *529 Pt 1*, 37–47.
- Rizzuto, R., Duchen, M.R., and Pozzan, T. (2004). Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca<sup>2+</sup> liaison. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2004*, re1.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 566–578.
- Robert, V., Gurlini, P., Tosello, V., Nagai, T., Miyawaki, A., Di Lisa, F., and Pozzan, T. (2001). Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac cells. *EMBO J.* *20*, 4998–5007.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput. Biol.* *13*.
- Rohde, K., Kleinesudeik, L., Roesler, S., Löwe, O., Heidler, J., Schröder, K., Wittig, I., Dröse, S., and Fulda, S. (2017). A Bak-dependent mitochondrial amplification step contributes to Smac mimetic/glucocorticoid-induced necroptosis. *Cell Death Differ.* *24*, 83–97.
- Rolfe, D.F., and Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.*
- Ross, M.F., Kelso, G.F., Blaikie, F.H., James, A.M., Cochemé, H.M., Filipovska, A., Da Ros, T., Hurd, T.R., Smith, R. a. J., and Murphy, M.P. (2005). Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochem. Biokhimiia* *70*, 222–230.
- Ross, M.F., Prime, T.A., Abakumova, I., James, A.M., Porteous, C.M., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (2008). Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *Biochem. J.* *411*, 633–645.
- Rossman Matthew J., Santos-Parker Jessica R., Steward Chelsea A.C., Bispham Nina Z., Cuevas Lauren M., Rosenberg Hannah L., Woodward Kayla A., Chonchol Michel, Gioscia-Ryan Rachel A., Murphy Michael P., et al. (2018). Chronic Supplementation With a Mitochondrial Antioxidant (MitoQ) Improves Vascular Function in Healthy Older Adults. *Hypertension* *71*, 1056–1063.

Roth, G.A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S.F., Abyu, G., Ahmed, M., Aksut, B., Alam, T., Alam, K., et al. (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J. Am. Coll. Cardiol.* *70*, 1–25.

Ruiz-Meana, M., Núñez, E., Miro-Casas, E., Martínez-Acedo, P., Barba, I., Rodríguez-Sinovas, A., Inserte, J., Fernández-Sanz, C., Hernando, V., Vázquez, J., et al. (2014). Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *68*, 79–88.

Ryu, S.-Y., Beutner, G., Dirksen, R.T., Kinnally, K.W., and Sheu, S.-S. (2010). Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca<sup>2+</sup> permeable channels. *FEBS Lett.* *584*, 1948–1955.

## ~ S ~

Sancak, Y., Markhard, A.L., Kitami, T., Kovács-Bogdán, E., Kamer, K.J., Udeshi, N.D., Carr, S.A., Chaudhuri, D., Clapham, D.E., Li, A.A., et al. (2013). EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science* *342*, 1379–1382.

Santo-Domingo, J., and Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *1797*, 907–912.

Santos, C.X.C., Raza, S., and Shah, A.M. (2016). Redox signaling in the cardiomyocyte: From physiology to failure. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *74*, 145–151.

Sartoretto, J.L., Kalwa, H., Pluth, M.D., Lippard, S.J., and Michel, T. (2011). Hydrogen peroxide differentially modulates cardiac myocyte nitric oxide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 15792–15797.

Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* *CB 24*, R453–462.

Schmidt, M.R., Redington, A., and Bøtker, H.E. (2015). Remote conditioning the heart overview: translatability and mechanism. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 1947–1960.

Schulman, I.H., and Hare, J.M. (2012). Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim. Biophys. Acta* *1820*, 752–762.

Schwartz, B.G., and Kloner, R.A. (2012). Coronary no reflow. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *52*, 873–882.

Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* *48*, 158–167.

Sethi, R., Takeda, N., Nagano, M., and Dhalla, N.S. (2000). Beneficial effects of vitamin E treatment in acute myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *5*, 51–58.

Shabalina, I., and J, N. (2011). Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not?

Shiva, S., and Gladwin, M. (2009). Nitrite mediates cytoprotection after ischemia/reperfusion by modulating mitochondrial function.

- Siger, A., Czubinski, J., Dwiecki, K., Kachlicki, P., and Nogala-Kalucka, M. (2013). Identification and antioxidant activity of sinapic acid derivatives in *Brassica napus* L. seed meal extracts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *115*, 1130–1138.
- Skyschally, A., Schulz, R., and Heusch, G. (2010). Cyclosporine A at Reperfusion Reduces Infarct Size in Pigs. *Cardiovasc. Drugs Ther.* *24*, 85.
- Smith, R.A., Porteous, C.M., Coulter, C.V., and Murphy, M.P. (1999). Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. *Eur. J. Biochem.* *263*, 709–716.
- Soetkamp, D., Nguyen, T.T., Menazza, S., Hirschhäuser, C., Hendgen-Cotta, U.B., Rassaf, T., Schlüter, K.D., Boengler, K., Murphy, E., and Schulz, R. (2014). S-nitrosation of mitochondrial connexin 43 regulates mitochondrial function. *Basic Res. Cardiol.* *109*, 433.
- Sokol, R.J., McKim, J.M., Goff, M.C., Ruyle, S.Z., Devereaux, M.W., Han, D., Packer, L., and Everson, G. (1998). Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* *114*, 164–174.
- Spencer, A.P., Carson, D.S., and Crouch, M.A. (1999). Vitamin E and Coronary Artery Disease. *Arch. Intern. Med.* *159*, 1313.
- Srisakuldee, W., Makazan, Z., Nickel, B.E., Zhang, F., Thliveris, J.A., Pasumarthi, K.B.S., and Kardami, E. (2014). The FGF-2-triggered protection of cardiac subsarcolemmal mitochondria from calcium overload is mitochondrial connexin 43-dependent. *Cardiovasc. Res.* *103*, 72–80.
- Starkov, A.A. (2008). The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1147*, 37–52.
- Starnes, J.W., Barnes, B.D., and Olsen, M.E. (2007). Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup>-induced dysfunction. *J. Appl. Physiol.* *102*, 1793–1798.
- Sun, J., and Murphy, E. (2010). Protein S-Nitrosylation and Cardioprotection. *Circ. Res.* *106*, 285–296.
- Sun, J., Morgan, M., Shen, R.-F., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2007a). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ. Res.* *101*, 1155–1163.
- Sun, J., Morgan, M., Shen, R.-F., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2007b). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ. Res.* *101*, 1155–1163.
- Sun, J., Kohr, M.J., Nguyen, T., Aponte, A.M., Connelly, P.S., Esfahani, S.G., Gucek, M., Daniels, M.P., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2012). Disruption of Caveolae Blocks Ischemic Preconditioning-Mediated S-Nitrosylation of Mitochondrial Proteins. *Antioxid. Redox Signal.* *16*, 45–56.
- Sun, J., Aponte, A.M., Kohr, M.J., Tong, G., Steenbergen, C., and Murphy, E. (2013). Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-Nitrosylation versus sGC/cGMP/PKG signaling? *Free Radic. Biol. Med.* *54*, 105–112.
- Sun, J., Nguyen, T., Aponte, A.M., Menazza, S., Kohr, M.J., Roth, D.M., Patel, H.H., Murphy, E., and Steenbergen, C. (2015a). Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *106*, 227–236.

Sun, J., Nguyen, T., Aponte, A.M., Menazza, S., Kohr, M.J., Roth, D.M., Patel, H.H., Murphy, E., and Steenbergen, C. (2015b). Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria. *Cardiovasc. Res.* *106*, 227–236.

Szabadkai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M.R., Cavagna, D., Nagy, A.I., Balla, T., and Rizzuto, R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Cell Biol.* *175*, 901–911.

Szeto, H.H. (2006). Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants. *AAPS J.* *8*, E277-283.

Szeto, H.H., and Schiller, P.W. (2011). Novel therapies targeting inner mitochondrial membrane--from discovery to clinical development. *Pharm. Res.* *28*, 2669–2679.

## ~ T ~

Takuma, K., Lee, E., Enomoto, R., Mori, K., Baba, A., and Matsuda, T. (2001). Ibutilast attenuates astrocyte apoptosis via cyclic GMP signalling pathway in an in vitro reperfusion model. *Br. J. Pharmacol.* *133*, 841–848.

Tarasov, A.I., Griffiths, E.J., and Rutter, G.A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* *52*, 28–35.

Tatarkova, Z., Kovalska, M., Sivonova, M.K., Racay, P., Lehotsky, J., and Kaplan, P. (2019). Tyrosine nitration of mitochondrial proteins during myocardial ischemia and reperfusion. *J. Physiol. Biochem.* *75*, 217–227.

Terentyev, D., Györke, I., Belevych, A., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., de Blanco, E., Khanna, S., Sen, C., Cardounel, A., et al. (2008). Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in chronic heart failure.

Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U., and Rassaf, T. (2015). Concepts of hypoxic NO signaling in remote ischemic preconditioning. *World J. Cardiol.* *7*, 645–651.

Trnka, J., Blaikie, F.H., Smith, R.A.J., and Murphy, M.P. (2008). A mitochondria-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 1406–1419.

Tummers, B., and Green, D.R. (2017). Caspase-8: regulating life and death. *Immunol. Rev.* *277*, 76–89.

Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., and Misra, M.K. (2004). Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J. Biomed. Biotechnol.* *2004*, 227–237.

## ~ U ~

Umar, S., and van der Laarse, A. (2010). Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart.

## ~ V ~

Valverde, C.A., Kornyejev, D., Ferreiro, M., Petrosky, A.D., Mattiazzi, A., and Escobar, A.L. (2010). Transient Ca<sup>2+</sup> depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* *85*, 671–680.

Vanden Hoek, T.L., Becker, L.B., Shao, Z., Li, C., and Schumacker, P.T. (1998). Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 18092–18098.

Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 700–714.

Veitch, K., Hombroeckx, A., Caucheteux, D., Pouleur, H., and Hue, L. (1992). Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage. *Biochem. J.* *281*, 709.

Vendrov, A.E., Vendrov, K.C., Smith, A., Yuan, J., Sumida, A., Robidoux, J., Runge, M.S., and Madamanchi, N.R. (2015). NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease. *Antioxid. Redox Signal.* *23*, 1389–1409.

Verma, S., Fedak, P.W.M., Weisel, R.D., Butany, J., Rao, V., Maitland, A., Li, R.-K., Dhillon, B., and Yau, T.M. (2002). Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* *105*, 2332–2336.

## ~ W ~

Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* *15*, 2922–2933.

Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis\*. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 95–118.

Wang, W., H, F., L, G., A, C., W, Z., J, L., X, W., K, L., P, H., M, Z., et al. (2008). Superoxide flashes in single mitochondria.

Wang, X., Zhang, X., Wu, D., Huang, Z., Hou, T., Jian, C., Yu, P., Lu, F., Zhang, R., Sun, T., et al. (2017). Mitochondrial flashes regulate ATP homeostasis in the heart. *ELife* *6*, e23908.

Warburton, D.E.R., Nicol, C.W., and Bredin, S.S.D. (2006). Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* *174*, 801–809.

Webster, K.A. (2012). Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: roles of calcium and reactive oxygen species. *Future Cardiol.* *8*, 863–884.

Wei, A.-C., Aon, M.A., O'Rourke, B., Winslow, R.L., and Cortassa, S. (2011). Mitochondrial energetics, pH regulation, and ion dynamics: a computational-experimental approach. *Biophys. J.* *100*, 2894–2903.

Wisløff, U., Loennechen, J.P., Currie, S., Smith, G.L., and Ellingsen, Ø. (2002). Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 54, 162–174.

Wolska, B.M., and Solaro, R.J. (1996). Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 271, H1250–H1255.

## ~ X ~

Xiaomeng, S., and Hongyu, Q. (2020). Post-Translational S-Nitrosylation of Proteins in Regulating Cardiac Oxidative Stress. *Antioxidants* 9, 1051.

Xu, Q., Kopp, R.F., Chen, Y., Yang, J.J., Roe, M.W., and Veenstra, R.D. (2012). Gating of connexin 43 gap junctions by a cytoplasmic loop calmodulin binding domain. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 302, C1548–C1556.

Xue, Q., Pei, H., Liu, Q., Zhao, M., Sun, J., Gao, E., Ma, X., and Tao, L. (2017). MICU1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury and its control by the importer receptor Tom70. *Cell Death Dis.* 8, e2923–e2923.

## ~ Y ~

Yates, K., Pohl, F., Busch, M., Mozer, A., Watters, L., Shiryaev, A., and Kong Thoo Lin, P. (2019). Determination of sinapine in rapeseed pomace extract: Its antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties. *Food Chem.* 276, 768–775.

Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *N. Engl. J. Med.* 357, 1121–1135.

Yeung, H., Hung, M., and Fung, M. (2008). Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia-reperfusion injury in chronically hypoxic rats.

Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14.

## ~ Z ~

Zampieri, S., Mammucari, C., Romanello, V., Barberi, L., Pietrangelo, L., Fusella, A., Mosole, S., Gherardi, G., Höfer, C., Löfler, S., et al. (2016). Physical exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics. *Physiol. Rep.* 4.

Zanella, B., Calonghi, N., Pagnotta, E., Masotti, L., and Guarnieri, C. (2002). Mitochondrial Nitric Oxide Localization in H9c2 Cells Revealed by Confocal Microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1010–1014.

- Zhang, J., Jin, B., Li, L., Block, E.R., and 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–C849.
- Zhao, K., Zhao, G.-M., Wu, D., Soong, Y., Birk, A.V., Schiller, P.W., and Szeto, H.H. (2004). Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury. *J. Biol. Chem.* *279*, 34682–34690.
- Zhao, W., Zhao, D., Yan, R., and Sun, Y. (2009). Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* *18*, 156–166.
- Zhao, Z., Js, C., Me, H., F, K., Np, W., Ra, G., and J, V.-J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.
- Zheng, D., Cao, T., Zhang, L.-L., Fan, G.-C., Qiu, J., and Peng, T.-Q. (2020). Targeted inhibition of calpain in mitochondria alleviates oxidative stress-induced myocardial injury. *Acta Pharmacol. Sin.*
- Zhou, H., Zhu, P., Wang, J., Zhu, H., Ren, J., and Chen, Y. (2018). Pathogenesis of cardiac ischemia reperfusion injury is associated with CK2 $\alpha$ -disturbed mitochondrial homeostasis via suppression of FUNDC1-related mitophagy. *Cell Death Differ.* *25*, 1080–1093.
- Zong, W.-X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* *20*, 1–15.
- Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J. Exp. Med.* *192*, 1001–1014.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* *94*, 909–950.
- Zweier, J.L., and Talukder, M.A.H. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* *70*, 181–190.
- Zweier, J.L., Samouilov, A., and Kuppasamy, P. (1999). Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1411*, 250–262.

**RÉSUMÉ**

L'infarctus du myocarde constitue la première cause de mortalité cardiovasculaire. A ce jour, la seule stratégie permettant de limiter la mort cellulaire au cours de l'ischémie cardiaque est la reperfusion. Néanmoins, elle est à l'origine de lésions qui lui sont propres. L'établissement d'un cercle vicieux entre la surproduction d'espèces réactives oxygénées mitochondriales (EROmt) et la surcharge calcique ( $Ca^{2+}$ ) matricielle semble être un acteur clé de l'exacerbation de la mort cellulaire dans les premiers instants de la reperfusion. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de développer et/ou de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de stratégies naturelles permettant de limiter l'établissement de ce cercle vicieux pour permettre une protection des mitochondries au cours de l'ischémie-reperfusion. Notre première stratégie a été d'identifier dans la nature des molécules antioxydantes dont les propriétés physico-chimiques permettent de cibler le stress oxydant mitochondrial. Nous avons pu identifier un antioxydant naturel, la sinapine dont les propriétés chimiques pourraient lui conférer un tropisme mitochondrial. On a ainsi pu démontrer *in vitro*, *in cellulo*, *ex vivo* et *in vivo* que la sinapine était capable de cibler le stress oxydant mitochondrial et ainsi diminuer la sensibilité du cœur à l'IR. La deuxième étude de ce travail de thèse consistait à mieux identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents à la cardioprotection par l'exercice physique. Une attention toute particulière a été portée sur le rôle clé joué par la signalisation du monoxyde d'azote (NO) au niveau mitochondrial. En effet, le NO est bien décrit comme pouvant moduler la production d'EROmt et comme permettant de protéger le cœur au cours de l'IR. Néanmoins, à ce jour, l'impact de l'exercice sur la signalisation eNOS-NO au niveau mitochondrial est mal connu. Nous avons pu observer qu'un entraînement modéré de 5 semaines était à l'origine d'une translocation de la eNOS au niveau des mitochondries et que celle-ci était associée à une augmentation de la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial et à une modification du s-nitrosoprotéome. Enfin, nous avons pu montrer que la S-nitrosylation joue un rôle clé dans la protection des mitochondries en situation de stress permettant de mimer l'ischémie-reperfusion.

**Mots clés :** cardioprotection, mPTP, antioxydant naturel, S-nitrosylation, ERO

**ABSTRACT**

Cardiovascular ischemic heart disease remains one of the main cause of morbidity and mortality worldwide. Reperfusion is essential to blunt cell death during ischemia. However, post-ischemic reperfusion exacerbates cell death during the first minute of reperfusion. This is mainly explained by the activation of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). A vicious circle between overproduction of mitochondrial ROS (mtROS) and matrix mitochondrial calcium overload ( $Ca^{2+}$ ) is proposed today as a main trigger of mPTP activation during IR. Thus, the aim of this work, was to **i)** proposed new strategy to blunt this vicious circle and protect mitochondria during IR or **ii)** better understand the underlying mechanisms of natural cardioprotective strategy. Targeting mitochondria with antioxidant is a promising strategy. In this work, we identified a natural antioxidant, sinapine, able to target mitochondrial oxidative stress. We reported that sinapine but not sinapic acid limit mitochondrial oxidative stress and ROS production during cardiac IR. In our second study, we decipher the role of nitric oxide in exercise-induced cardioprotection. We reported that exercise training resulted in eNOS translocation to mitochondria which impact the bioavailability of NO and the S-nitrosylation of mitochondrial key proteins involved in cardioprotection. Finally, we reported that S-nitrosylation played a key role in the protection of mitochondria during stress situations mimicking cardiac ischemia-reperfusion.

**Keywords :** cardioprotection, mPTP, natural antioxidant, S-nitrosylation, ROS