



**HAL**  
open science

# Impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion : interaction complexe entre dynamique mitochondriale, homéostasie calcique et production d'espèces réactives de l'oxygène

Mathilde Dubois

## ► To cite this version:

Mathilde Dubois. Impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion : interaction complexe entre dynamique mitochondriale, homéostasie calcique et production d'espèces réactives de l'oxygène. Autre [q-bio.OT]. Université d'Avignon, 2023. Français. NNT : 2023AVIG0372 . tel-04414103

**HAL Id: tel-04414103**

**<https://theses.hal.science/tel-04414103>**

Submitted on 24 Jan 2024

**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

Ecole Doctorale Agrosciences et Sciences, ED 536

Spécialité : **Physiologie**

Présentée par : **Mathilde DUBOIS**

---

Impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion : interaction complexe entre dynamique mitochondriale, homéostasie calcique et production d'espèces réactives de l'oxygène

---

Soutenue publiquement le **24 Novembre 2023** devant le jury composé de :

M. WAI Timothy	DR CNRS, Institut Pasteur, Paris	<b>Rapporteur</b>
M. MOURIER Arnaud	CR CNRS, IBGC, Bordeaux	<b>Rapporteur</b>
Mme PAILLARD Mélanie	CR INSERM, CarMeN, Lyon	<b>Examinatrice</b>
Mme VERGELY Catherine	PU, PEC2, Université de Dijon	<b>Examinatrice</b>
M. LANDRIER Jean-François	DR INRAE, C2VN, Marseille	<b>Examineur</b>
M. REBOUL Cyril	MCU-HDR, Avignon Université	<b>Directeur de thèse</b>



## Remerciements

Au terme de ces quatre années de thèse au Laboratoire de Physiologie Expérimentale Cardiovasculaire (LaPEC), je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont accompagnée et soutenue dans cette aventure.

### **Aux membres du jury,**

Je tiens tout d'abord à remercier **M. Wai et M. Mourier** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Merci d'avoir consacré du temps pour lire et évaluer mon manuscrit. C'est un grand privilège pour moi d'avoir pu compter sur votre expertise et d'avoir bénéficié de vos remarques pertinentes et constructives. Je tiens également à remercier **Mme Vergely, Mme Paillard et M. Landrier** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux en tant qu'examineurs. Ce sera un réel plaisir pour moi de pouvoir échanger avec vous le jour de la soutenance.

### **A mon directeur de thèse,**

Je tiens particulièrement à te remercier toi, **Cyril**, pour tout ce que tu m'as apporté avant et pendant ces quatre années de thèse. Je crois profondément que mon intérêt pour la physiologie et mon désir de poursuivre sur un doctorat ont émergé suite aux cours de physiologie que tu nous as dispensés en Licence. Tu as su directement me transmettre ta passion et ton excitation pour les sciences et me donner envie de faire de la recherche. D'ailleurs, je te suis reconnaissante de m'avoir sollicitée quelques années après, pour réaliser ma thèse avec toi. Merci de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir cru en moi. J'espère avoir été à la hauteur de tes espérances et t'avoir rendu fier. En tout cas pour ma part, je me sens chanceuse d'avoir pu bénéficier d'un encadrant aussi passionné et brillant que toi. T'es un réel exemple du type de chercheur que j'aimerais être plus tard. Tout au long de ce doctorat, tu m'as non seulement transmis ton expertise scientifique, mais tu m'as aussi fait évoluer personnellement. Tu m'as fait prendre confiance en moi, tu m'as poussé à me surpasser et à donner le meilleur de moi-même et je t'en remercie. Tes conseils avisés, ton soutien sans faille et ta bonne humeur quotidienne m'ont permis de réaliser ce doctorat dans les meilleures conditions. Alors que je m'apprête maintenant à débiter une nouvelle expérience dans un laboratoire renommé à l'autre bout du monde, je n'oublierai pas que tout ça c'est en grande partie grâce à toi. J'ai hâte de vivre cette nouvelle aventure scientifique et de pouvoir la partager avec toi. Parce que oui, compte sur moi pour te donner de mes nouvelles et te parler mitochondrie même à 7069 km. Et puis, qui sait, on aura peut-être l'opportunité un jour de travailler de nouveau ensemble.

### **A l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail de thèse,**

Tout d'abord, merci à la directrice du LaPEC, **Agnès Vinet** de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire et de m'avoir apporté son soutien tout au long de mon doctorat.

Un grand merci à **Isabelle Barnard** pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta joie de vivre à chaque séance de microscopie. Merci pour le temps que tu as consacré à me former au microscope confocal ainsi que l'intérêt que tu as porté à mon étude et mes expérimentations. Tu m'as initié au monde de la microscopie en me partageant ta passion, tes compétences et ta rigueur scientifique. J'ai adoré découvrir ce domaine, qui m'a d'ailleurs



émerveillée plus d'une fois. La photo de notre mitochondrie spiralée prendra d'ailleurs place sur mon bureau aux Etats-Unis (à défaut d'avoir pris place dans le couloir de la fac des sciences).

Merci également à nos collaborateurs de la plateforme de ProGénoMix du CEA de Marcoul, **Jean-Charles Gaillard, Jean Armengaud** et particulièrement **Béatrice Alpha-Bazin**, qui s'est montrée très disponible et très impliquée dans nos projets. Merci de l'intérêt que tu as porté à mon sujet d'étude et pour le temps que tu y as consacré.

Je tiens également à remercier notre personnel technique, la team des 3 supers nanas, **Christine, Sandrine et Doria**, sans qui le laboratoire tournerait beaucoup moins bien. Merci **Christine** d'être autant impliquée dans le bien-être de nos animaux et de nous permettre de manipuler dans une animalerie toujours impeccable. Merci également pour ton aide lors de mes expérimentations de chirurgie ainsi que pour ta bonne humeur quotidienne ; le laboratoire a beaucoup de chance de t'avoir. Merci également à **Sandrine**, d'avoir toujours fait en sorte que l'on soit dans les meilleures conditions possibles pour réaliser nos expérimentations. Merci de t'être si bien occupée du déménagement du laboratoire, car bon, sans toi, je pense qu'on serait toujours en train de manipuler au 58<sup>ème</sup> RI. Merci également pour m'avoir formée aux techniques de biochimie lors de mon arrivée, pour tes conseils, pour ton aide dans les manip et pour ta contribution à la bonne ambiance générale du labo. Pour finir, merci à toi **Dodo** pour m'avoir initiée au domaine de la mitochondrie et m'avoir formée sur la majorité des techniques du labo. T'as clairement été la meilleure formatrice qui soit et tu resteras pour moi la Queen de la mitochondrie. Merci pour ta patience, ta bienveillance et tes conseils précieux. T'as énormément contribué à ce travail de thèse et je t'en remercie. En tout cas, je suis trop fière du chemin que t'as parcouru depuis que je t'ai rencontrée et je suis plus qu'heureuse que tu fasses partie intégrante de ce laboratoire maintenant.

Merci infiniment aux chercheurs de **l'équipe NO-Stress (Cyril, Greg, Guillaume, Florence)** pour toutes ces réunions du lundi matin qui m'ont permises d'évoluer scientifiquement et de faire mûrir mon projet de thèse. Merci pour vos remarques pertinentes, votre soutien et vos vannes à répétition. Vous êtes une sacrée team de rigolos. En tout cas, je me sens chanceuse d'avoir pu bénéficier d'un environnement scientifique aussi complet et bienveillant.

Enfin, merci aux stagiaires, les deux **Maxime, Gilles et Flo** d'avoir permis de faire avancer grandement ce projet de thèse. Merci pour les nombreuses heures que vous avez passées en salle de manip et pour l'intérêt que vous avez porté à mon étude. Entre les cardiomyocytes jetés dans l'évier, l'agitateur coincé dans le poste de cœur isolé ou encore le 162mM, je garde un souvenir mémorable de votre passage au laboratoire. Plus sérieusement, merci pour votre contribution à ce projet de thèse, pour tous les bons moments passés ensemble et les nombreux apéros after-work. Vous avez été des stagiaires au top. Je vous souhaite que du bonheur pour la suite et un bon courage à ceux qui sont actuellement en thèse.

## **A l'ensemble des personnes qui ont contribué à faire de ma thèse une aventure humaine inoubliable,**

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des titulaires avec qui j'ai partagé mon quotidien pendant 4 ans. Merci à **Greg**, pour ta joie de vivre quotidienne, ta bienveillance et ton immense gentillesse. Je garderai en tête tous les bons moments passés ensemble, que ce soit les journées ski, les nocturnes des Papes ou encore les soirées labo. Merci d'avoir été mon lièvre lors des footings à la colline (même si des fois j'avais envie de te couper les jambes). Quoi qu'il en soit, tu fais partie des personnes ayant participé à faire de ma thèse une expérience incroyable et je t'en remercie. Merci à **Guillaume** d'avoir contribué à la bonne ambiance du laboratoire et d'avoir toujours été le premier motivé pour partager des bières avec nous. T'es une personne vraiment cool et je te souhaite le meilleur pour la suite, que ce soit dans le pro et le perso. Merci également à **Florence** pour ta gentillesse, ton soutien tout au long de ma thèse et tes nombreux conseils. Merci de nous avoir motivés de nombreuses fois à participer aux congrès jeunes chercheurs et à nous faire un réseau ; j'en garde un très bon souvenir (les moscow mule y sont peut-être pour quelque chose). Je te souhaite que du bonheur pour la suite.

Je tiens également à remercier l'ensemble des titulaires du laboratoire avec qui j'ai beaucoup apprécié discuter : **Marielle, Sophie, Yannick, Claire, Stéphane, Philippe, Catherine, Pascal.**

Enfin, merci à **Christophe (Mazzia)** pour m'avoir captivé et transmis ta passion pour les sciences dès la licence. Les étudiants d'Avignon ont beaucoup de chance d'avoir des enseignants comme toi et Cyril. En tout cas, j'ai adoré pouvoir, après avoir été l'étudiante, passer de l'autre côté et assurer les TP de physio avec toi. J'admire ta joie de vivre, ta pédagogie et ton humour piquant avec les étudiants tout en restant pour autant sérieux et exigeant. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je tiens maintenant à remercier mes amis doctorants et post-doctorants qui m'ont soutenu et accompagné pendant ces 4 ans de thèse. **Dodo**, ma première voisine de bureau, merci pour tout ce que tu m'as apporté pendant cette thèse, tant sur le plan professionnel que sur le personnel. T'es une personne incroyable et je me sens chanceuse de pouvoir te compter parmi mes amies. J'ai adoré les moments passés ensemble, que ce soit les séances de sport, les apéros after-work, les sessions ski ou encore notre petit week-end à Nice (et dire que j'aurai pu rajouter nos vacances en Corse s'il n'y avait pas eu ce Covid). Quoi qu'il en soit, ces moments ensemble et toutes nos discussions (en autres les potins) vont beaucoup me manquer. Sache que ma porte à Cincinnati est grande ouverte et que tu viens quand tu veux. En tout cas, je te souhaite que le meilleur pour la suite et j'espère que tu t'épanouiras pleinement dans ta nouvelle vie, tu le mérites. Merci également à **Sydney** d'avoir été un petit rayon de soleil pendant mes premières années de thèse. Tu m'as directement mise à l'aise lors de mon arrivée et t'as clairement contribué à rendre ma thèse plus fun. Je suis heureuse de savoir que maintenant tu exerces pleinement le métier qui te plaît et que t'as pu rejoindre tes montagnes qui te manquaient tant. Merci à **Antoine**, le sanchito, pour ton soutien sans faille et tes précieux conseils tout au long de ma thèse. T'es une personne extrêmement généreuse qui a toujours été là pour nous encourager, nous conseiller et nous faire rire. Je m'apprête à vivre une nouvelle aventure dans un super labo (et oui, chez Zizou) et je sais que tout ça c'est en grande partie grâce à toi. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir pensé à moi, même à plus de 700km, et de

m'avoir encouragé à saisir cette opportunité de dingue. En tout cas, maintenant que tu as pu revenir ici, dans la région du « oui ma gâtée », je te souhaite que du bonheur, à toi et ta petite famille. Un grand merci également à **Alexandra** pour ta joie de vivre, ta bienveillance et tous les bons moments (arrosés) passés ensemble. Merci **Gaétan** pour ta gentillesse sans limite et tes petites blagues/mésaventures qui nous ont fait rire plus d'une fois. J'ai apprécié tous les moments passés avec toi et je te souhaite de t'épanouir pleinement dans tous les aspects de ta vie. Je tiens également à remercier mon binôme de bioénergétique et mon prof de sport préféré alias **Yann**, pour avoir ajouté une touche de fraîcheur et de folie à mon aventure de thèse. Tu es finalement resté qu'un an au labo mais pour autant je garde plein de bons souvenirs en tête. J'ai directement apprécié la personne que tu es, une personne extrêmement bienveillante, attachante et toujours positive. J'ai adoré nos moments passés ensemble et nos nombreuses discussions autour d'une bière. Nos cours sur le terrain, un sifflet dans une main et un verre de rooibos dans l'autre vont me manquer. Un grand merci aussi à **Sylvain** pour ton soutien pendant ma thèse, tes remarques toujours pertinentes et tes conseils précieux. T'es une personne hyper intéressante, brillante et inspirante. J'ai vraiment apprécié travailler avec quelqu'un comme toi. Je garde également un trop bon souvenir de notre séjour à Najac avec Matt, où on a pu découvrir ton nouveau chez-toi et partager de supers moments ensemble. Je te souhaite que du bonheur dans ta nouvelle vie. Enfin merci **Léna** d'avoir partagé mon quotidien pendant ces deux dernières années de thèse. J'ai appris à connaître une personne sensible, à l'écoute et hyper attentionnée. Ton arrivée au labo m'a fait beaucoup de bien (et a permis d'amener un peu de girl power dans ce groupe de mecs !). Je garde de supers souvenirs des moments passés ensemble, que ce soit autour d'un verre (ou d'un flash), en plein bivouac dans le Verdon ou lors des petits week-end organisés. Merci également d'avoir été là pour moi lors de mes coups de mou, de m'avoir soutenue et encouragée de nombreuses fois. J'espère sincèrement que de ton côté, tu continueras à prendre confiance en toi, à dépasser tes limites et à être fière de toi à la fin de ta thèse. Je te souhaite que du bonheur pour la suite et n'hésites pas, avec Gaël, lors de votre tour du monde, à passer me faire un coucou à Cincinnati. Merci également à **Thomas, Gilles, Maxime et Marc** pour les moments passés ensemble, au labo et en dehors. J'ai beaucoup aimé partager cette aventure de thèse avec vous.

Pour finir, je termine évidemment par **Matt et Flo**, mes deux acolytes qui ont fait de ma thèse une expérience inoubliable. Je me sens chanceuse d'avoir pu compter sur ce trio infernal pendant pratiquement toute ma thèse. Vous avez été une force, une motivation quotidienne ainsi qu'une source de réconfort inégalable quand ça n'allait pas, et pour tout ça, je vous remercie du fond du cœur. Sachez en tout cas que je n'en serai pas là sans vous. Je garde en mémoire toutes ces aventures qu'on a vécu ensemble, aux quatre coins de la France, et je peux vous dire que ça me manque déjà. **Matt** je tiens à te remercier plus particulièrement d'avoir été là pour moi du début jusqu'à la fin. Je n'aurai pas pu rêver d'un meilleur binôme de thèse que toi. On s'est toujours soutenu, encouragé et tiré vers le haut. Je t'admire pour ta persévérance et ton mental à toute épreuve. J'ai adoré nos débats interminables, nos nombreuses soirées à l'explo et notre passion mutuelle pour les petits potins du labo. T'as été mon petit arc en ciel de thèse (au sens propre) et un acolyte hors pair pour mettre l'ambiance au labo (parce que oui, t'es un sacré petit rigolo). Sache que tu pourras toujours compter sur moi ; les amis comme toi je les compte sur les doigts d'une main. Je te souhaite le meilleur pour la suite et je compte sur toi pour venir rapidement boire des bières à Cincinnati.

### **A l'ensemble des personnes qui m'ont soutenue pendant cette thèse,**

Un immense merci à mes potes **Cécile et Corentin** d'être présents pour moi depuis la Licence. Qui aurait cru que ces trois petits fayots de la L3 BSE en arriveraient là aujourd'hui. En tout cas, je me sens chanceuse de vous avoir dans ma vie et de pouvoir compter sur vous. Je vous remercie d'avoir partagé cette aventure de thèse avec moi et de m'avoir soutenue dans chaque étape de cette thèse. Vous allez me manquer, beaucoup. **Coco**, je sais que c'est bientôt ton tour et je t'envoie toute ma force pour cette dernière ligne droite (même si j'ai aucun doute sur le fait que tu vas assurer). Je suis vraiment déçue de pas pouvoir être là pour partager ce moment avec toi mais bon compte sur moi pour regarder ça en visio dans mon petit appart à Cincinnati. Bon courage à toi aussi ma **Céc** pour cette grosse épreuve qui t'attend. Je crois en toi, depuis le début, et je suis persuadée que ta persévérance et ton mental d'acier vont finir par payer. Je compte sur vous en tout cas pour venir me voir à Cincinnati dès que possible. Merci également à **Tom** pour tous les moments qu'on a passé ensemble ces dernières années. Nos petits combo Explo-El taquito vont me manquer. Enfin, merci à **Gouven** pour ses sorties bike and run qui m'ont permis de décompresser un peu avant la thèse.

Merci à **mes parents** de m'avoir soutenue et encouragée tout au long de cette thèse (même si vous n'avez toujours pas vraiment compris sur quoi je travaille). Merci d'être aussi fiers de moi à chaque étape de ma vie ; sans votre soutien, je n'en serai pas là aujourd'hui. J'ai conscience de la chance que j'ai d'avoir des parents comme vous. Merci également à ma sœur **Camille**, et mon frère **Maxence** de me supporter depuis toutes ces années, je sais à quel point c'est une tâche difficile. Plus sérieusement, merci d'être là pour moi et d'avoir toujours cru en moi. Je profite de ces remerciements à l'écrit pour vous dire, à tous les quatre, que je vous aime. Merci également à mes pseudos beau-papa et belle-maman, **Murielle et David** ainsi qu'à ma « belle-famille », **Adeline, Pascal, Marine et Léa** de m'avoir soutenue tout au long de cette thèse. Sans oublier, **Jean et Jérôme** qui m'ont accueilli plus d'une fois en Corse et qui m'ont permis de rédiger mon manuscrit de thèse dans les meilleures conditions possibles.

Pour finir, évidemment, merci à **Nico**. Merci de m'aimer (et de me supporter surtout) depuis plus de 10 ans maintenant. J'ai adoré vivre cette aventure qu'est la thèse avec toi. Pouvoir partager mutuellement nos galères, nos doutes, nos joies a été une chance énorme. Je ne te remercierai jamais assez pour le soutien sans faille que tu m'as apporté tout au long de cette thèse. Tu as toujours été là pour m'encourager, me réconforter et surtout croire en moi. T'as été ma plus grande source de motivation et clairement je n'en serai pas là sans toi. Je me sens tellement chanceuse de partager ma vie avec quelqu'un comme toi. Et je rejoins Jérôme : tout le monde devrait avoir un Nico dans sa vie. En tout cas, il est maintenant temps de dire au revoir à cette belle aventure de thèse et à se lancer ensemble dans un nouveau défi (et pas des moindres). Je ne vais pas mentir, j'ai un peu les chocottes mais j'ai hâte de partager cette nouvelle aventure avec toi. Je pense que le meilleur nous attend. Quoi qu'il en soit, je suis fière de toi, fière de nous et fière du chemin qu'on a parcouru ensemble.

## Liste des publications

- **M.Dubois**, D.Boulghobra, G.Rochebloine, F.Pallot, M.Yehya, I.Bornard, S.Gaynard, F.Coste, G.Walther, G.Meyer, J.Gaillard, J.Armengaud, B.Alpha-Bazin, C.Reboul. Altered mitochondrial calcium homeostasis in hyperglycemia triggers rat heart vulnerability to ischemia-reperfusion : key role of DRP1. *Soumis, Redox Biology*
- **M.Dubois**, D.Boulghobra\*, F.Pallot\*, F.Coste, G.Walther, G.Meyer, I.Bornard, C.Reboul. Exercise training limits mitochondrial fission during myocardial ischemia-reperfusion. *Soumis, Journal of General Physiology (JGP)*
- D.Boulghobra, **M.Dubois**, B.Alpha-Bazin, F.Coste, M.Olmos, S.Gaynard, I.Bornard, G.Meyer, J.Gaillard, J.Armengaud, C.Reboul. (2021). Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection. *Basic Res Cardiol. 2021 Dec 23;116(1):66. doi: 10.1007/s00395-021-00906-3.*
- G.Boléa, C.Philouze, **M.Dubois**, S.Risdon, A. Humberclaude, C.Ginies, A-L. Charles, B.Geny, C.Reboul, C.Arnaud, C.Dufour, G.Meyer. (2021) « Digestive n-6 Lipid Oxidation, a Key Trigger of Vascular Dysfunction and Atherosclerosis in the Western Diet: Protective Effects of Apple Polyphenols ». *Mol Nutr Food Res. 2021 Mar;65(6):e2000487. doi: 10.1002/mnfr.202000487. Epub 2021 Feb 2.*

## Liste des communications

### Communication orale :

- **Septembre 2023 - Présentation orale en anglais - Groupe Français de Bioénergétique (GFB), Bédoin (84).** « Hyperglycemia-induced mitochondrial fission impacts the sarcoplasmic reticulum-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> interplay: a key role in mPTP activation ». **M.Dubois**, D.Boulghobra, B.Alpha-Bazin, I.Bornard, S.Gayrard, G.Walther, G.Meyer, C.Reboul.
- **Juin 2021 - e-Présentation orale en anglais - EMBO Workshop: Cardiomyocyte Biology** « Acute hyperglycemia increased cytosolic ROS production: a key role in mitochondria permeability transition » **M.Dubois**, D.Boulghobra, F.Pallot, G.Bolea, F.Coste, G.Meyer, G.Walther, C.Reboul.

### Poster commenté /Flash presentation :

- **Mai 2023 – Flash présentation – Printemps de la Cardiologie, Marseille** «Hyperglycemia-induced mitochondrial fission impact the sarcoplasmic reticulum–mitochondrial calcium interplay: a key role in mPTP activation » **M.Dubois**, D.Boulghobra, B.Alpha-Bazin; I.Bornard; S.Gayrard, G.Walther, G.Meyer, C.Reboul
- **Juin 2022 – Flash présentation – Printemps de la Cardiologie, Tours** « Transient hyperglycemia triggers mitochondrial vulnerability to ischemia-reperfusion » **M.Dubois**, G.Rochebloine , F.Pallot, D.Boulghobra , F.Coste, G.Meyer, G.Walther, I.Bornard, C.Reboul
- **Mai 2022 – Flash présentation et poster commenté – Workshop Meetchondrie, Cap Ferret** « Hyperglycemia-induced cytosolic ROS production trigger mitochondrial vulnerability to Ischemia-Reperfusion » **M.Dubois**, G.Rochebloine , F.Pallot, D.Boulghobra , F.Coste, G.Meyer, G.Walther, I.Bornard, C.Reboul.
- **Mai 2021 - e-Poster commenté - Printemps de la Cardiologie** «Acute hyperglycemia increased cytosolic ROS production: a key role in mitochondria permeability transition » **M. Dubois**, D.Boulghobra, F.Pallot, G.Bolea, F.Coste, G.Meyer, G.Walther, C.Reboul.
- **Octobre 2020 - e-Poster commenté - Printemps de la Cardiologie** « Acute hyperglycemia increased heart sensitivity to ischemia-reperfusion: preliminary results reveal potential interactions between cardiac oxidative stress and mitochondria » **M. Dubois**, D.Boulghobra, M.Olmos, F.Coste, G.Bolea, G.Meyer, G.Walther, C.Reboul.

# Table des matières

Introduction.....	1
Revue de littérature .....	6
Chapitre 1 : La mitochondrie : un acteur central des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique ..	7
I.    Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion myocardique.....	7
1.    Généralités .....	7
2.    Mécanismes cellulaires de l'ischémie-reperfusion .....	8
a.    Lésions liées à l'ischémie.....	8
b.    Lésions liées à la reperfusion.....	10
II.    La mitochondrie : acteur majeur des lésions d'ischémie-reperfusion.....	11
1.    La mitochondrie au centre de l'homéostasie cellulaire cardiaque .....	11
a.    La mitochondrie : centrale énergétique cardiaque.....	12
b.    La mitochondrie comme régulateur du statut redox cellulaire .....	14
c.    Place de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cardiomyocytaire.....	15
i.    Homéostasie calcique cardiomyocytaire.....	15
ii.    Homéostasie calcique mitochondriale .....	20
iii.    Importance de l'interaction mitochondrie-réticulum dans l'homéostasie calcique mitochondriale .....	24
d.    Dynamique mitochondriale cardiomyocytaire : mythe ou réalité ? .....	28
i.    Rôle de la fission et fusion mitochondriale .....	29
ii.    Mécanismes impliqués dans la fission mitochondriale.....	34
iii.    Régulation de la fission mitochondriale.....	38
iv.    Mécanismes impliqués dans la fusion mitochondriale .....	39
v.    Régulation de la fusion mitochondriale .....	40
2.    Altérations mitochondriales lors de l'ischémie-reperfusion.....	42
a.    Surproduction d'EROmt au cours de l'IR.....	42
b.    Surcharge calcique mitochondriale au cours de l'IR .....	45
c.    Cercle vicieux entre ERO et Ca <sup>2+</sup> au cours de l'IR .....	48
d.    Ouverture du mPTP: « a pore way to die ».....	50
e.    Altérations de la dynamique mitochondriale lors de l'IR.....	54

<b>Chapitre 2 : L'hyperglycémie comme facteur aggravant les lésions d'ischémie-reperfusion : mécanismes cellulaires et place de la mitochondrie.....</b>	<b>57</b>
I. Homéostasie glucidique et dysfonctions associées .....	57
II. Impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR : mécanismes cellulaires sous- jacents .....	59
1. Métabolisme du glucose dans le cœur.....	59
2. Glucotoxicité cardiaque au cours de l'IR : mécanismes sous-jacents .....	60
a. Surproduction d'ERO : un élément clé de la glucotoxicité cardiaque .....	62
b. Troubles de l'homéostasie calcique .....	64
c. Altérations de la dynamique mitochondriale.....	66
<b>Matériels &amp; Méthodes.....</b>	<b>70</b>
I. Design expérimental.....	71
1. Groupes expérimentaux.....	71
2. Organisation des expérimentations .....	72
II. Evaluation des paramètres biologiques et physiologiques .....	73
1. Expérimentations suite à un protocole d'ischémie-reperfusion cardiaque.....	73
a. Ischémie-reperfusion in vivo .....	73
b. Evaluation de la taille d'infarctus .....	74
c. Ischémie-reperfusion sur cœur isolé-perfusé .....	75
d. Mesure de la production d'ERO post-IR.....	76
e. Evaluation de la dynamique mitochondriale cardiaque post-IR .....	77
i. Microscopie électronique à transmission .....	77
ii. Western Blot.....	78
iii. Analyse « shotgun » protéomique par nLC-MS/MS.....	79
2. Expérimentations sur cardiomyocytes isolés .....	81
a. Isolement de cardiomyocytes .....	81
b. Mesure de la production d'ERO cardiomyocytaire .....	82
c. Mesure de l'entrée de Ca <sup>2+</sup> dans les mitochondries cardiomyocytaires.....	82
d. Mesure des transitoires calciques et des vagues calciques spontanées.....	84
3. Expérimentations sur mitochondries isolées .....	85
a. Isolement de mitochondries .....	85



b.	Mesure de la production d'EROmt.....	86
c.	Mesure de la concentration calcique matricielle.....	86
d.	Evaluation de la capacité de rétention calcique (CRC) et de la cinétique d'entrée de Ca <sup>2+</sup> dans la mitochondrie.....	87
4.	Analyses statistiques.....	88
<b>Résultats.....</b>		<b>90</b>
<b>Discussion.....</b>		<b>140</b>
I.	Discussion et perspectives.....	141
II.	Limites de l'étude.....	145
III.	Conclusion générale.....	146
<b>Articles annexes.....</b>		<b>148</b>

## Index des figures

Figure 1 : La reperfusion post-ischémique, une épée à double tranchant dans la survie du tissu myocardique (Adaptée de Hausenloy et al, 2013).....	8
Figure 2 : Représentation schématique des principales conséquences cellulaires de l'ischémie myocardique.....	9
Figure 3: Représentation schématique des principales conséquences cellulaires de la reperfusion myocardique.....	11
Figure 4 : Représentation schématique des principales voies du métabolisme énergétique mitochondrial.....	13
Figure 5 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire formé par le récepteur à la ryanodine 2 (RyR2) et ses protéines régulatrices associées. (Yano et al, 2009).....	16
Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage moléculaire et de la stœchiométrie de l'unipporteur calcique mitochondrial (MCU) (Garbincius et Elrod, 2022).....	22
Figure 7 : Enregistrement simultané des oscillations calciques cytosoliques et mitochondriales cardiomyocytaires en réponse à une stimulation électrique (Hamilton et al, 2021).....	25
Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation structurale de l'interaction mitochondrie-réticulum au sein du cardiomyocyte adulte.....	28
Figure 9 : Rôles et conséquences biologiques de la fusion et fission mitochondriale (Westermann et al, 2010).....	32
Figure 10 : Structure et mécanismes d'action de Drp1 dans la fission mitochondriale (Quiles et al, 2022).....	35
Figure 11 : Rôle du réticulum dans la constriction et la fission mitochondriale chez la levure (Friedman et al, 2011). Modèle 3D représentant les points de contact entre le réticulum endoplasmique (vert) et la mitochondrie (violet).....	36
Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la fusion et fission mitochondriale (Giacomello et al, 2020).....	37
Figure 13 : Représentation schématique du rôle possible des interactions mitochondrie-réticulum dans l'établissement du cercle vicieux entre surcharge calcique et surproduction d'ERO au cours de l'IR...49	49
Figure 14 : Evolution du modèle concernant l'identité moléculaire du mPTP (Kwong et Molkenin, 2014).....	53
Figure 15 : Relation entre la glycémie lors de l'admission à l'hôpital et la mortalité à 30 jours et 1 an post-infarctus du myocarde chez des patients avec ou sans diabète diagnostiqué. (adaptée de Kosiborod et al, 2005).....	61
Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation des expérimentations.....	72

Figure 17 : Mesure des différentes zones d'intérêt sur les coupes de cœur post-IR après coloration au TTC et au bleu Evans.....	74
Figure 18 : Représentation schématique du poste de cœur isolé perfusé de Langendorff.....	76
Figure 19 : Mesure de l'aire des mitochondries (jaune) et du rapport longueur/largeur des mitochondries (rouge) sur des coupes de tissus myocardiques imagées en microscopie électronique à transmission (plateforme $\mu$ 3A).....	77
Figure 20 : Mesure de la distance (flèches noires) entre la mitochondrie (trait bleu) et le réticulum sarcoplasmique (trait rouge) ainsi que de la longueur de la zone d'interaction (trait noir) sur des coupes de tissus myocardiques imagées en microscopie électronique à transmission (plateforme $\mu$ 3A).....	78
Figure 21 : Colocalisation entre la sonde Rhod-2 et le Mitotracker Green.....	83
Figure 22 : Mesure de l'entrée de $Ca^{2+}$ dans la mitochondrie sur cardiomyocytes isolés stimulés électriquement (électrodes de champ, Myopacer IONOPTIX).....	84
Figure 23 : Enregistrement des transitoires calciques et des vagues calciques spontanées (flèches rouges) sur cardiomyocytes isolés stimulés électriquement (électrodes de champ, Myopacer IONOPTIX). L'analyse des transitoires calciques a consisté à mesurer l'amplitude du transitoire (double flèche rouge) et la cinétique de recapture (trait orange).....	85
Figure 24 : Evaluation de la capacité de rétention calcique mitochondriale (CRC) sur mitochondries isolées.....	87
Figure 25 : Evaluation de la cinétique d'entrée de $Ca^{2+}$ dans la mitochondrie..	88

## Liste des abréviations

**$\Delta\Psi_m$**  : potentiel de membrane mitochondrial

**Acétyl-CoA** : acétyl-Coenzyme A

**ADP** : adénosine diphosphate

**AMPc** : adenosine monophosphate cyclique

**ATP** : adénosine triphosphate

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>** : concentration de Ca<sup>2+</sup> cytosolique

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>** : concentration de Ca<sup>2+</sup> dans la matrice mitochondriale

**CaM** : calmoduline

**CaMKII** : *Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dependent protein Kinase II*

**CASQ2** : calséquestrine de type 2

**CICR** : *Calcium-Induced Calcium Release*

**CEC** : couplage excitation-contraction

**CoQ** : coenzyme Q ou ubiquinone mitochondriale

**CTE** : chaîne de transport des électrons

**Cyt c** : cytochrome c

**DHPR** : récepteurs à la dihydropyridine

**Drp1** : *dynamamin-related protein 1*

**EMRE** : *essential MCU regulator*

**ERK1/2** : *extracellular signal-regulated kinase 1/2*

**ERO** : espèces réactives de l'oxygène

**EROMt** : espèces réactives de l'oxygène d'origine mitochondriale

**FADH<sub>2</sub>** : Flavine adénine dinucléotide

**FIS1** : *Mitochondrial fission protein 1*

**GLUT** : transporteur de glucose

**GRP75** : *glucose-regulated protein 75*

**GTP / GDP** : guanosine triphosphate / guanosine diphosphate

**GTPase** : enzyme intracellulaire hydrolysant le GTP en GDP

**H<sup>+</sup>** : proton

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**HG** : hyperglycémie

**IP3R** : récepteur à l'inositol triphosphate

**IR** : ischémie-reperfusion

**LTCC** : canaux Ca<sup>2+</sup> voltage-dépendants de type L

**MAMs** : *mitochondria-associated membranes*

**MCUb** : paralogue dominant-négatif de MCU

**MCUc** : complexe de l'uniporteur de calcium mitochondrial

**MCUR1** : *mitochondrial calcium uniporter regulator 1*

**Mdivi-1** : *mitochondrial division inhibitor*  
**MFF** : *Mitochondrial fission factor*  
**Mfn** : mitofusine  
**mHCX** : échangeur mitochondrial H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
**MICU1&2** : *mitochondria calcium uptake 1 & 2*  
**mPTP** : mégapore de transition de perméabilité mitochondriale

**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide  
**NCX** : échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
**NCLX** : échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/ Li<sup>+</sup>  
**NG** : normoglycémie  
**NHE** : échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>  
**NO** : monoxyde d'azote  
**NOX2 ; NOX 4** : NADPH oxydase 2 ; 4

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : anion superoxide  
**OH<sup>•</sup>** : radical hydroxyle  
**ONOO<sup>-</sup>** : peroxydinitrite  
**OPA1** : *optic atrophy type 1*

**PDH** : pyruvate déshydrogénase  
**Pi** : phosphate inorganique  
**PKA** : *cAMP-dependent protein kinase / protein kinase A*  
**PMCA** : *plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase*  
**Po** : probabilité d'ouverture

**RaM** : *rapid uptake mode*  
**RE** : réticulum endoplasmique  
**RIRR** : *ROS-induced ROS release*  
**RS** : réticulum sarcoplasmique  
**RSj** : RS jonctionnel  
**RyR** : récepteur à la ryanodine

**Ser616** : serine 616  
**Ser637** : serine 637  
**SERCA** : *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*  
**SOD** : superoxide dismutase  
**STZ** : streptozotocine

**TCA** : cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs

**VDAC** : *voltage dependent anion channel*  
**VG** : ventricule gauche

# INTRODUCTION

L'infarctus du myocarde, plus communément appelé « crise cardiaque » constitue la forme la plus mortelle des cardiopathies ischémiques. On estime en France qu'environ 80 000 personnes en sont victimes chaque année, dont 12 000 en décèdent (INSERM, 2017). Bien que la mortalité liée à l'infarctus du myocarde ait grandement chuté ces dernières décennies (Laforgia et al., 2022), les cardiopathies ischémiques constituent un problème majeur de santé publique puisqu'elles restent la première cause de mortalité à l'échelle mondiale (OMS, 2020). L'infarctus du myocarde correspond à une nécrose d'une partie du muscle cardiaque, consécutive à l'occlusion totale ou partielle d'une ou plusieurs artère(s) coronaire(s). Privées d'oxygène et de nutriments, les cellules cardiaques en aval de l'obstruction coronaire se retrouvent dans une situation d'ischémie, correspondant à un déséquilibre entre les apports réels et les besoins en oxygène des tissus. Dès lors, la seule solution thérapeutique pour limiter les dommages cellulaires est la reperfusion des tissus ischémiés. Bien que la restauration du flux sanguin soit essentielle pour mettre fin à l'épisode ischémique, elle entraîne paradoxalement des lésions cardiaques additionnelles qui lui sont propres, appelées lésions de reperfusion (Fliss & Gattinger, 1996). Parmi ces lésions, on distingue notamment l'accélération de la mort cellulaire au cours des premières minutes de la reperfusion (E. Murphy & Steenbergen, 2008; Piper et al., 2004) qui contribuera de manière plus ou moins importante à l'étendue de la zone infarctée et ainsi à la sévérité de l'infarctus du myocarde.

La mitochondrie est aujourd'hui bien décrite comme un acteur clé de la mort cellulaire au cours de l'infarctus du myocarde. En effet, bien que les mitochondries occupent une place centrale dans la survie cellulaire, notamment à travers leur rôle bien décrit dans le métabolisme énergétique, elles peuvent aussi réguler les processus conduisant à la mort de la cellule. Dans le contexte particulier de l'ischémie-reperfusion (IR), la réoxygénation brutale et massive des territoires ischémiés va permettre au niveau cardiomyocytaire, de rétablir la respiration mitochondriale et la production d'adénosine triphosphate (ATP) ; cependant cette reperfusion est à double tranchant puisqu'elle va engendrer de nombreux désordres mitochondriaux contribuant à l'établissement d'un cercle vicieux entre surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et surcharge calcique mitochondriale. Celui-ci va *in fine* aboutir à l'ouverture prolongée du mégapore de transition de perméabilité mitochondriale : le mPTP (Baines et al., 2005; Haworth & Hunter, 1979; Nakagawa et al., 2005). L'ouverture de ce dernier entraîne une perte de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale, un effondrement du potentiel de membrane suivi d'un gonflement de la matrice, une rupture des membranes mitochondriales et la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Ainsi, l'ouverture prolongée du mPTP est généralement considérée comme un « point de non-retour » jouant un rôle majeur dans l'augmentation de la mort cellulaire suite à un infarctus du myocarde.

Récemment, l'interaction entre le réseau mitochondrial et le réticulum sarcoplasmique (RS) apparaît comme un nouvel acteur dans la physiopathologie cardiaque en exacerbant le cercle vicieux entre surproduction d'ERO, surcharge calcique et activation du mPTP au cours de l'IR (Lopez-Crisosto et al., 2017; Ruiz-Meana et al., 2010). En effet, il est admis qu'une portion membranaire des mitochondries est en interaction étroite avec le réticulum via des connexions protéiques dynamiques, créant ainsi des microdomaines fonctionnels au sein de la cellule appelés « Mitochondria-associated membranes » (MAMs). Ces interactions mitochondrie-réticulum ont été impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que le transfert de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et de lipides, la dynamique mitochondriale, l'apoptose, l'autophagie ainsi que la génération d'ERO (Gao et al., 2020; Lopez-Crisosto et al., 2017). De part cette communication privilégiée, les MAMs sont reconnues comme des plateformes d'échanges de  $\text{Ca}^{2+}$  mais également d'ATP (Kaasik et al., 2001; Wilding et al., 2006) et d'ERO (Davidson & Duchon, 2006; Ruiz-Meana et al., 2010), d'où l'importance de leur régulation en physiologie cardiaque. D'ailleurs, de manière intéressante, la réduction des interactions mitochondrie-réticulum au niveau cardiaque atténue la surcharge calcique mitochondriale et protège les cardiomyocytes de l'hypoxie-réoxygénation (Paillard et al., 2013). Cette étude souligne l'importance de la régulation des MAMs et de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie dans les troubles de la fonction mitochondriale au cours de l'IR. A ce jour, le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum vers la mitochondrie semble assuré par le complexe protéique IP3R-GRP75-VDAC. Cependant, dans les cellules excitables telles que les cardiomyocytes, les mouvements intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  sont principalement attribués à l'ouverture du récepteur à la ryanodine de type 2 (RyR2) au cours du couplage excitation-contraction (CEC), permettant la genèse du transitoire calcique essentiel à la contraction myocardique. Néanmoins, dans le cadre de l'IR, bien que la fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RyR2 soit assez bien décrite (Bovo et al., 2018; Fauconnier et al., 2011), son rôle dans les troubles de l'homéostasie calcique mitochondriale au cours de l'IR demeure mal compris. En effet, il est admis que le RyR2 est localisé préférentiellement au niveau du RS jonctionnel (RSj) qui fait face au tubule T dans l'espace dyadique (Bootman et al., 2006; Brochet et al., 2005), l'éloignant ainsi des points de contact avec la mitochondrie. Néanmoins, certains travaux suggèrent une localisation du RyR2 à proximité des mitochondries cardiomyocytaires (Boncompagni et al., 2009; Sharma et al., n.d.), tandis que d'autres rapportent une localisation au niveau des MAMs (Chen et al., 2012) où il formerait un complexe avec VDAC2 (Min et al., 2012). Ces résultats pourraient notamment contribuer à expliquer les variations rythmiques, battement par battement, de la concentration calcique dans les mitochondries cardiomyocytaires. Ainsi, RyR2 pourrait constituer un acteur majeur des échanges calciques entre le réticulum et les mitochondries dans les cardiomyocytes.



Ces zones particulières d'interactions entre les membranes mitochondriales et les membranes du réticulum, les MAMs, sont également bien décrites pour leur rôle clé dans la dynamique mitochondriale correspondant notamment à l'équilibre entre la fusion et la fission des mitochondries. De manière intéressante, au cours de l'IR, de nombreuses études ont rapporté une fission excessive des mitochondries associée à une altération de l'homéostasie calcique (Sharp et al., 2014), une surproduction d'ERO (Disatnik et al., 2013), une activation précoce du mPTP et *in fine* une sensibilité accrue du cœur à l'IR (Ong et al., 2010). Parmi les acteurs participant à la fission mitochondriale, la protéine GTPase cytosolique Dynamin-related protein 1 (Drp1) ainsi que le réticulum sont reconnus comme jouant un rôle clé dans la constriction de la membrane externe mitochondriale. Plus précisément, il a été rapporté que l'activation de Drp1 induit sa translocation vers la mitochondrie, au niveau des points de contacts entre la mitochondrie et le réticulum. Suite à cela, les tubules du réticulum, associés à du cytosquelette d'actine, initient ensemble la constriction de la membrane externe mitochondriale. Drp1 s'oligomérisent ensuite en anneau contracteur menant à la fission de la mitochondrie. Au-delà de ce rôle canonique, l'implication de Drp1 dans l'homéostasie cellulaire semble être plus complexe. Récemment, il a été démontré que Drp1 contribue à la tubulation du réticulum, indépendamment de son oligomérisation, facilitant ainsi l'interaction entre les mitochondries et le réticulum (Adachi et al., 2020). Drp1 a également été proposé comme jouant un rôle dans l'activation du mPTP (Zhang et al., 2017), l'apoptose (Jenner et al., 2022) et la mitophagie (Tong et al., 2023). Par ailleurs, plus récemment Drp1 a été rapporté comme étant présent au niveau des MAMs où il colocaliserait avec RyR2 (Tong et al., 2023), suggérant qu'au-delà de son rôle dans la fission mitochondriale, Drp1 pourrait de façon plus générale, être un acteur clé dans l'interaction mitochondrie-réticulum. De manière intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur de Drp1, le Mdivi-1 (« mitochondrial division inhibitor »), au cours de l'IR préserve la morphologie mitochondriale, diminue la surproduction d'ERO et la surcharge calcique cytosolique (Sharp et al., 2014), prévient l'ouverture du mPTP et *in fine* réduit la zone infarctée (Ong et al., 2010). Ainsi, de par ses rôles canoniques et non-canoniques, Drp1 semble participer au cercle vicieux entre surproduction d'ERO, surcharge calcique et activation du mPTP au cours de l'IR.

Parmi les facteurs contribuant à l'aggravation des lésions de reperfusion, l'hyperglycémie *per se* est apparue ces dernières années comme un facteur prédictif de la sévérité de l'infarctus du myocarde (Kosiborod et al., 2005). Plusieurs études cliniques rapportent que le niveau de glycémie lors de l'admission à l'hôpital est positivement corrélé à la taille de l'infarctus du myocarde et au pronostic vital du patient (Ishihara et al., 2009; Mather et al., 2010). De manière intéressante, cette sensibilité du cœur à l'hyperglycémie est plus marquée chez les patients non diabétiques, par rapport aux

patients diabétiques admis avec une glycémie similaire (Eitel et al., 2012; Ishihara et al., 2009). Cette glucotoxicité a également été confirmée par des études expérimentales rapportant une augmentation de la sévérité de l'infarctus lorsque l'IR est réalisée en condition d'hyperglycémie (Ham et al., 2019; Yang et al., 2013). Cependant, malgré un constat scientifique clair, les mécanismes cellulaires sous-jacents expliquant comment l'hyperglycémie *per se* sensibilise le cœur à l'IR, restent mal compris. A ce jour, il est admis que l'hyperglycémie conduit à une surproduction d'ERO au niveau cardiomyocytaire mais la source de ces ERO, mitochondriale (Sedlic et al., 2017) et/ou cytosolique (Lu et al., 2020) demeure controversée. Par ailleurs, l'hyperglycémie semble également impacter l'homéostasie calcique cellulaire en favorisant l'instabilité du RyR2 (Lu et al., 2020). Il est dès lors intéressant de noter qu'*in vitro* sur une lignée cellulaire H9C2, l'hyperglycémie *per se* est à l'origine d'une fission excessive des mitochondries via un mécanisme dépendant du calcium cytosolique (Yu et al., 2011). Cette fragmentation est de plus associée à une surproduction d'ERO (Kobayashi et al., 2020; Yu et al., 2011) et à une activation précoce du mPTP (Yu et al., 2008). De manière intéressante, l'utilisation d'un mutant dominant-négatif pour Drp1 sur des cellules H9C2 prévient la fission mitochondriale exacerbée en hyperglycémie, diminue la production d'ERO et retarde l'ouverture du mPTP (Yu et al., 2008), suggérant un rôle clé de Drp1 dans la glucotoxicité cellulaire.

Ainsi, il semble, au regard de la littérature, que l'hyperglycémie *per se* puisse impacter l'interaction complexe entre dynamique mitochondriale, production d'ERO et homéostasie calcique. Ces travaux ont pour la plupart été conduits sur des modèles cellulaires assez éloignés des cardiomyocytes cardiaques. Ainsi, à ce jour, l'impact réel de l'établissement de ces interactions complexes dans les effets délétères de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR demeure à investiguer.

**L'objectif principal de cette thèse a donc été 1) d'évaluer le rôle de l'interaction complexe entre dynamique mitochondriale, homéostasie calcique et production d'ERO dans la sensibilité accrue du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie et 2) d'évaluer le rôle de Drp1 dans ce phénomène.**



# REVUE DE LITTÉRATURE

## **Chapitre 1 : La mitochondrie : un acteur central des lésions d'ischémie-reperfusion myocardique**

### **I. Physiopathologie de l'ischémie-reperfusion myocardique**

#### **1. Généralités**

L'ischémie myocardique se définit comme un déséquilibre entre les besoins réels tissulaires et les apports en oxygène et en substrats nutritifs par le sang artériel coronaire. Lors d'un infarctus du myocarde, l'ischémie résulte d'une obstruction partielle ou totale du réseau artériel coronaire, suite à la sténose ou à la formation d'un thrombus consécutif à la rupture d'une plaque d'athérome. Dès lors, l'ischémie est dite régionalisée puisqu'elle est localisée dans la zone en aval de l'obstruction coronaire. À ce jour, la seule solution thérapeutique efficace pour mettre fin à l'épisode ischémique et limiter la sévérité de l'infarctus est la reperfusion du territoire ischémié, de façon médicamenteuse (agents thrombolytiques) ou interventionnelle (angioplastie ou pontage coronarien). L'occurrence et la sévérité des altérations cellulaires liées à l'ischémie sont directement dépendantes de la durée de l'occlusion coronaire, principal déterminant des lésions ischémiques (De Luca et al., 2004; Reimer et al., 1977), mais également de l'étendue de la zone ischémiée (appelée zone à risque) ainsi que de l'existence de collatéralité. Lors d'une ischémie de courte durée, on observe une réversibilité de l'ischémie par la reperfusion permettant une récupération fonctionnelle et métabolique totale du tissu préalablement ischémié. Cependant au-delà d'une durée « seuil » d'occlusion, évaluée à environ 20-25 min sur des modèles animaux (Palmer et al., 2004; Reimer et al., 1977), l'ischémie entraîne des lésions irréversibles conduisant à la mort des cellules contractiles du myocarde et *in fine* à l'établissement d'une zone infarctée. Ainsi, la restauration du flux sanguin s'avère cruciale pour la survie du myocarde et doit être effectuée le plus précocement possible. Cependant, bien qu'elle permette la stabilisation de la taille de l'infarctus en évitant l'infarcissement complet de la zone à risque, la reperfusion entraîne paradoxalement des lésions cellulaires additionnelles qui lui sont propres, appelées lésions de reperfusion (Fliss & Gattinger, 1996; Jennings et al., 1960) (Figure 1). Parmi celles-ci, on distingue (i) le phénomène de sidération myocardique correspondant à une dysfonction contractile transitoire du myocarde lors de la reperfusion (Braunwald & Kloner, 1982) (ii) le phénomène de no-reflow par lequel des altérations de la microcirculation compromettent la restauration du flux sanguin coronaire (Niccoli et al., 2010) (iii) les arythmies de reperfusion traduisant des troubles du rythme lors de la reperfusion, et enfin (iv) les lésions léthales de reperfusion

correspondant à l'exacerbation de la mort des cardiomyocytes qui étaient initialement viables à la fin de l'ischémie (Murphy & Steenbergen, 2008; Piper et al., 2004). Ces lésions léthales apparaissent dès les premières minutes de la reperfusion et représentent à ce jour, de par leur caractère irréversible, la complication la plus sévère du syndrome d'IR. On sait aujourd'hui que l'extension des lésions cellulaires due à la reperfusion pourrait représenter 40 à 50% de la taille finale de l'infarctus (Yellon & Hausenloy, 2007)(Figure 1). Plusieurs études ont d'ailleurs montré qu'une intervention thérapeutique administrée uniquement au début de la reperfusion permettait de réduire la taille de l'infarctus (Garcia-Dorado et al., 1992; Schluter et al., 1991). Ainsi, l'appellation actuelle de syndrome d'IR rappelle que les lésions tissulaires suite à un infarctus du myocarde sont à la fois le résultat de l'ischémie mais également de la reperfusion.

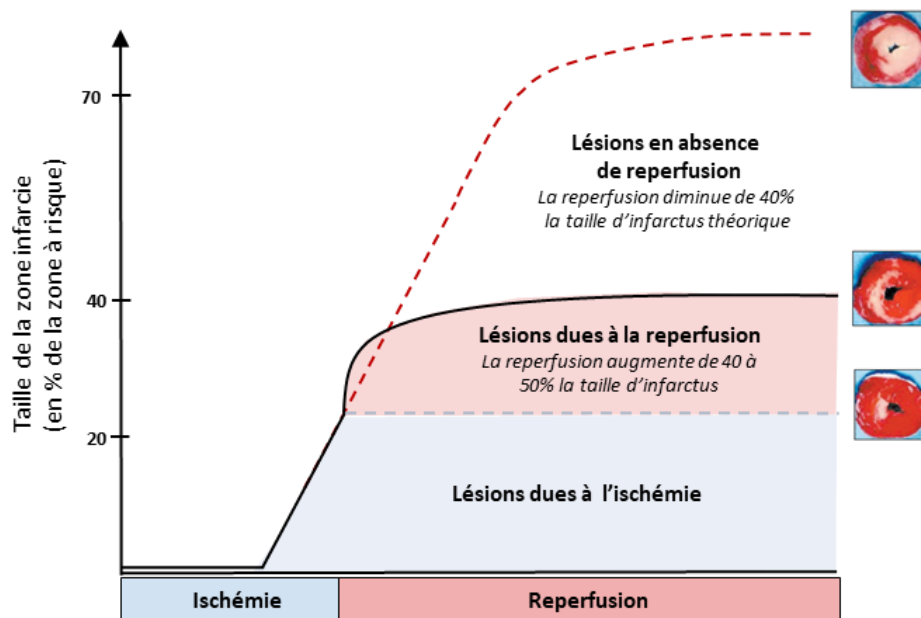


Figure 1 : La reperfusion post-ischémique, une épée à double tranchant dans la survie du tissu myocardique (Adaptée de Hausenloy et al, 2013)

## 2. Mécanismes cellulaires de l'ischémie-reperfusion

### a. Lésions liées à l'ischémie

Lors de l'ischémie, la production par phosphorylation oxydative de composés riches en énergie, tels que l'ATP devient insuffisante pour assurer le métabolisme et la survie des cardiomyocytes. Le muscle cardiaque ne disposant que de faibles réserves énergétiques, on observe alors très rapidement, dès 15 secondes d'ischémie (Benhabbouche et al., 2011) un « switch » métabolique au profit de la glycolyse anaérobie, qui devient la principale source de production d'ATP

de la cellule. Toutefois, cette dernière est peu rentable sur le plan énergétique et la conversion du pyruvate en lactate induit une accumulation intracellulaire de protons  $H^+$  (Figure 2). Face à l'acidose cellulaire, l'échangeur  $Na^+/H^+$  (NHE) s'active afin d'extruder les protons de la cellule mais cela s'accompagne d'une surcharge en  $Na^+$ , accentuée par la réduction de l'activité de la pompe  $Na^+/K^+$  ATPase due à la déplétion en ATP. En conséquence, l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) s'active en mode « reverse » pour corriger la surcharge sodique mais cela est à l'origine d'une augmentation marquée de la concentration calcique cellulaire (Figure 2). Lorsque l'ischémie perdure, les pompes responsables du maintien de l'homéostasie calcique, telles que la pompe SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase) ou la pompe  $Ca^{2+}$  ATPase sarcolemmale (PMCA) se retrouvent inhibées par la déplétion en ATP, exacerbant davantage la surcharge calcique cytosolique qui se répercute progressivement au niveau mitochondrial. En parallèle, l'effondrement du potentiel de membrane mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), suite à la déplétion en  $O_2$ , entraîne une inversion de l'activité de l'ATP synthase qui va alors hydrolyser l'ATP, accentuant ainsi sa déplétion (Jennings et al., 1991; Rouslin et al., 1990). Ces troubles ioniques entraînent *in fine* une altération de l'activité contractile, une production résiduelle d'ERO mais également l'activation d'enzymes  $Ca^{2+}$  dépendantes telles que les phospholipases et les calpaïnes qui vont entraîner la fragilisation des membranes cellulaires et la désorganisation du cytosquelette. Ces désordres cellulaires sont à l'origine de lésions irréversibles, essentiellement par nécrose des cardiomyocytes dès 20 à 30 minutes d'ischémie.

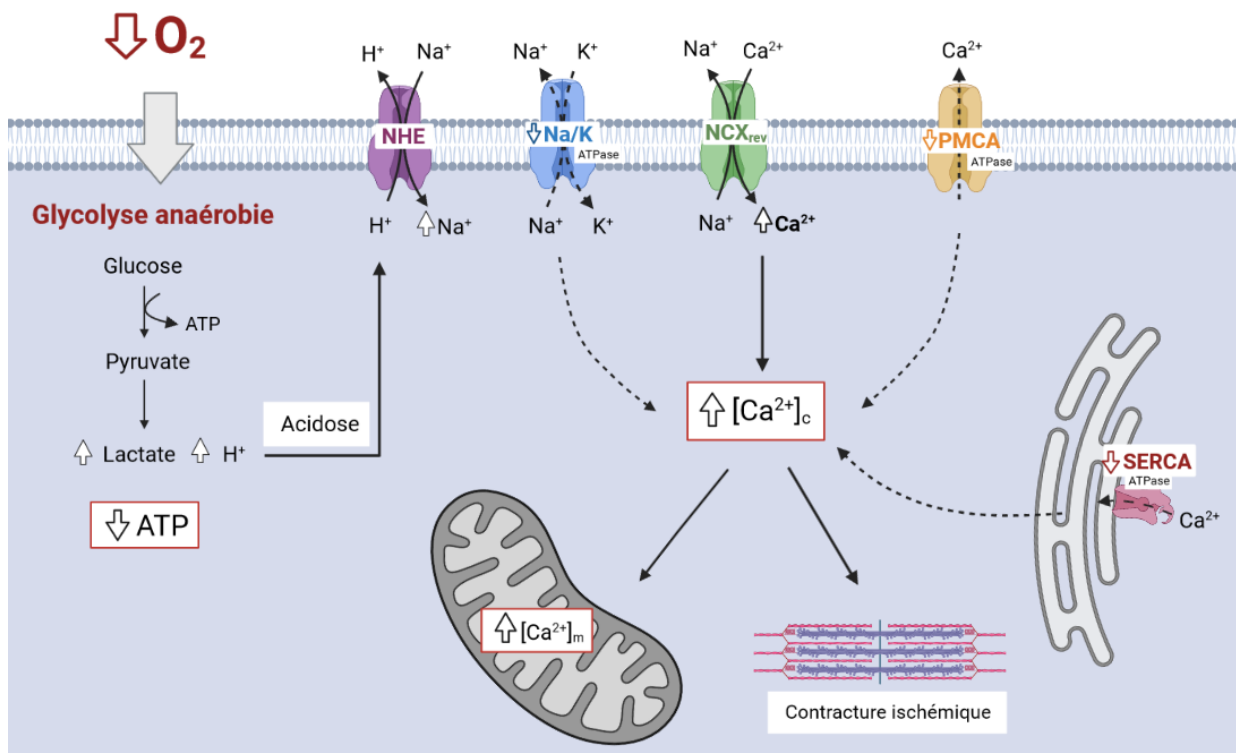


Figure 2 : Représentation schématique des principales conséquences cellulaires de l'ischémie myocardique

## b. Lésions liées à la reperfusion

La réintroduction brutale et massive de l'oxygène dans les cardiomyocytes va être à l'origine d'altérations cellulaires dès les premières minutes de la reperfusion. En effet, la reprise de la phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire mitochondriale, fonctionnellement endommagée par l'ischémie, va s'accompagner d'une production massive d'ERO, dépassant largement les capacités des systèmes antioxydants cellulaires. Ce « burst oxydatif » va avoir des effets délétères sur la fonction cardiomyocytaire en induisant notamment des lésions au niveau des membranes cellulaires par peroxydation lipidique, une carboxylation des protéines mais également des dommages au niveau de l'ADN. Parallèlement, le rétablissement du flux sanguin permet l'élimination des produits de la glycolyse anaérobie et la correction de l'acidose en quelques minutes, mais entraîne à nouveau une surcharge cellulaire sodique puis calcique (Figure 3). Cette dernière va exacerber le phénomène de contracture sarcomérique causée par la restauration de l'activité contractile ATP-dépendante des myofibrilles, combinée à la concentration anormalement élevée de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Schäfer, 2001). De plus, la production massive d'ERO à la reperfusion va participer à l'exacerbation de cette surcharge calcique en impactant, via des modifications post-traductionnelles, le statut redox de certaines protéines impliquées dans l'homéostasie calcique et le couplage excitation-contraction. Notamment, la production simultanée d'ERO et de monoxyde d'azote (NO) entraîne une oxydation et/ou une S-nitrosylation du RyR2 (Fauconnier et al., 2011; Yano et al., 2005) responsables de fuites calciques diastoliques du RS lors de la reperfusion (Yano et al., 2005; Zima & Mazurek, 2016) (voir Chapitre 1/II.2.b). D'autres études semblent également suggérer une diminution de l'activité de la pompe SERCA lors de la reperfusion suite à l'oxydation de certaines de ses cystéines (Kuster et al., 2010; Qin et al., 2013). La libération spontanée de  $Ca^{2+}$  par le RyR2, associée à une réduction du contenu calcique du réticulum va favoriser l'apparition d'oscillations calciques incontrôlées, contribuant à l'altération de la fonction contractile myocardique, à la contracture ischémique et aux arythmies cellulaires. L'ensemble de ces phénomènes vont à travers l'exacerbation de la surcharge calcique cytosolique contribuer aux altérations de la fonction mitochondriale (Figure 3). En effet, la reprise du fonctionnement de la chaîne respiratoire permet de restaurer le  $\Delta\Psi_m$  permettant ainsi, via l'augmentation de l'électronégativité de la matrice mitochondriale, de stimuler l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie. Ainsi, la normalisation du pH intracellulaire, la production massive d'ERO et la surcharge calcique mitochondriale vont être à l'origine de l'ouverture du mPTP, considérée comme un processus clé dans l'apparition des lésions de reperfusion (Figure 3). En effet, l'ouverture de ce dernier est responsable d'une perte de perméabilité de la membrane interne mitochondriale suivie d'un effondrement du  $\Delta\Psi_m$  et d'un épuisement des réserves d'ATP. L'ensemble de ces phénomènes vont rapidement être suivis par un gonflement matriciel, causé par une entrée massive d'eau et d'ions dans



la mitochondrie, pouvant aller jusqu'à la rupture des membranes mitochondriales et à la libération du cytochrome c et autres facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. L'ouverture du mPTP est classiquement reconnue comme un point de non-retour puisqu'elle conduit à la mort des cardiomyocytes par nécrose et/ou apoptose en fonction de l'état énergétique des cellules et de l'atteinte mitochondriale.

Ainsi, de par ses conséquences irréversibles, la mort cellulaire représente la lésion de reperfusion la plus sévère suite à un infarctus du myocarde. Le rôle de la mitochondrie dans les lésions d'IR et les mécanismes moléculaires menant à l'ouverture du mPTP sont décrits plus en détail dans la partie Chapitre 1/ II.2. du manuscrit.

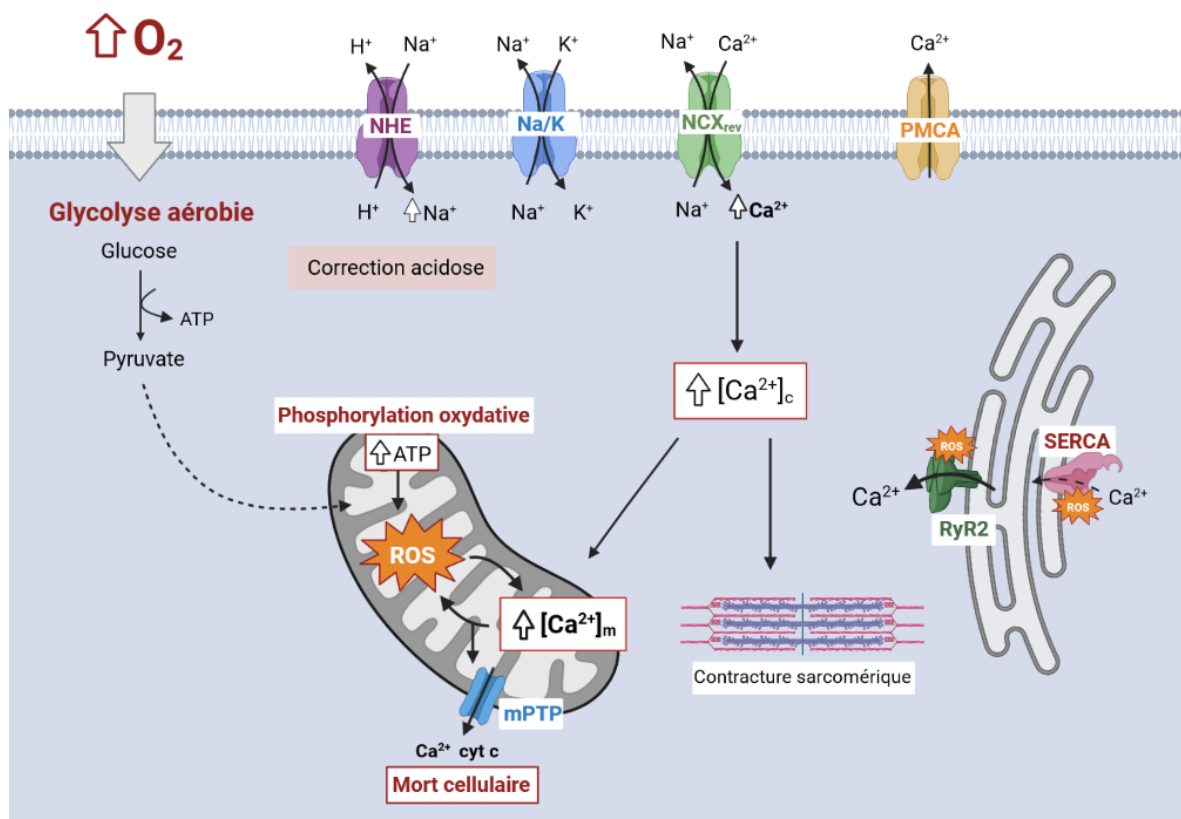


Figure 3 : Représentation schématique des principales conséquences cellulaires de la reperfusion myocardique

## II. La mitochondrie : acteur majeur des lésions d'ischémie-reperfusion

### 1. La mitochondrie au centre de l'homéostasie cellulaire cardiaque

Afin d'assurer une fonction contractile continue, le cœur consomme quotidiennement une masse d'ATP qui dépasse son propre poids d'environ 10 fois (Murphy et al., 2016). Ayant une capacité étonnamment faible à stocker l'énergie, le cœur doit assurer un flux énergétique quotidien élevé via une production d'ATP rapide et constante, assurée en quasi-totalité par la phosphorylation oxydative

(>95%). Par conséquent, il n'est pas surprenant, qu'en tant qu'organe le plus métaboliquement actif de l'organisme, le cœur possède la plus grande quantité de mitochondries de tous les tissus, avoisinant 25 à 30% du volume total des cardiomyocytes (Barth et al., 1992). En produisant quotidiennement environ 6kg d'ATP, les mitochondries cardiaques assurent le maintien d'une fonction contractile continue et permettent au cœur de battre 100 000 fois par jour (Neubauer, 2007). Il semblerait qu'environ 90% de l'ATP produit est utilisé pour soutenir le cycle de contraction-relaxation cardiaque, tandis que le reste permettrait d'assurer principalement le transport des ions dans la cellule en alimentant les pompes ATPase dépendantes. Il est intéressant de noter que la densité mitochondriale cardiaque augmente de l'homme à la souris parallèlement à l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la consommation d'oxygène (Schaper et al., 1985). Cependant, bien que les mitochondries aient longtemps été décrites uniquement comme des citernes énergétiques, il est aujourd'hui admis qu'en influençant pratiquement toutes les fonctions cellulaires, ces organites sont indispensables à la survie de la cellule. En effet, les mitochondries sont reconnues comme régulant la thermogénèse, la signalisation redox, l'homéostasie calcique, la synthèse des stéroïdes mais également la mort cellulaire programmée. Dans la suite du manuscrit nous développeront particulièrement les mécanismes mitochondriaux intervenant dans la production d'ERO (Chapitre 1/II.1.b) et la régulation du calcium (Chapitre 1/II.1.c), deux éléments clés du fonctionnement mitochondrial impliqués dans les lésions d'IR.

### **a. La mitochondrie : centrale énergétique cardiaque**

Afin de répondre à la demande énergétique tout en s'adaptant aux changements de l'environnement (disponibilité en O<sub>2</sub> et nutriments dans le sang ; modification de la charge de travail lors d'un exercice physique), les mitochondries cardiaques ont développé une plasticité dans l'utilisation des substrats. Chez l'adulte sain, les acides gras sont le substrat préférentiel du myocarde, fournissant environ 60 à 90% de l'approvisionnement énergétique total (Murphy et al., 2016). Les autres substrats utilisés sont le glucose (10 à 30%), le lactate (10%) et dans une moindre mesure les corps cétoniques et les acides aminés (Glatz et al., 2020; Stanley et al., 2005). Les acides gras sont oxydés dans la matrice mitochondriale par le processus de  $\beta$ -oxydation, tandis que le pyruvate dérivé du glucose et du lactate est oxydé par l'enzyme mitochondriale pyruvate déshydrogénase (PDH) (Figure 4). Le produit de ces deux voies, l'acétyl-Coenzyme A (Acétyl-CoA), entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) ou cycle de Krebs et subit une série de réactions au cours desquelles les électrons sont extraits des intermédiaires du TCA sous la forme de coenzymes réduits NADH et FADH<sub>2</sub>. Ces deux transporteurs d'électrons alimentent ensuite la chaîne de transport des électrons (CTE) pour la synthèse d'ATP. Plus précisément les molécules de NADH sont oxydées par le complexe I tandis que le

FADH<sub>2</sub> est oxydé par le complexe II. Le 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) et aboutissant à la réduction de l'O<sub>2</sub> moléculaire (accepteur final d'électrons) en H<sub>2</sub>O par le complexe IV (Figure 4). Le transport des électrons entre les complexes I, II et III est assuré par la coenzyme Q (CoQ ou ubiquinone) tandis que le cytochrome c (cyt c) fait la navette entre le complexe III et IV. L'énergie fournie par le transfert des électrons est utilisée par les différents complexes (hormis le complexe II) pour le pompage actif des protons H<sup>+</sup> de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de concentration de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce gradient électrochimique (ou force proton motrice) se compose d'une différence de  $\Delta\Psi_m$  (~180mV) et d'une différence de pH entre la matrice et l'espace intermembranaire. Du fait d'un gradient électrochimique favorable, les protons précédemment expulsés vont retourner dans la matrice par l'intermédiaire de l'ATP synthase (ou ATPase F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub> ou complexe V). L'énergie potentielle fournie par cette translocation de protons est utilisée par l'ATP synthase pour catalyser la réaction de phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP+P<sub>i</sub>) en ATP (Figure 4).

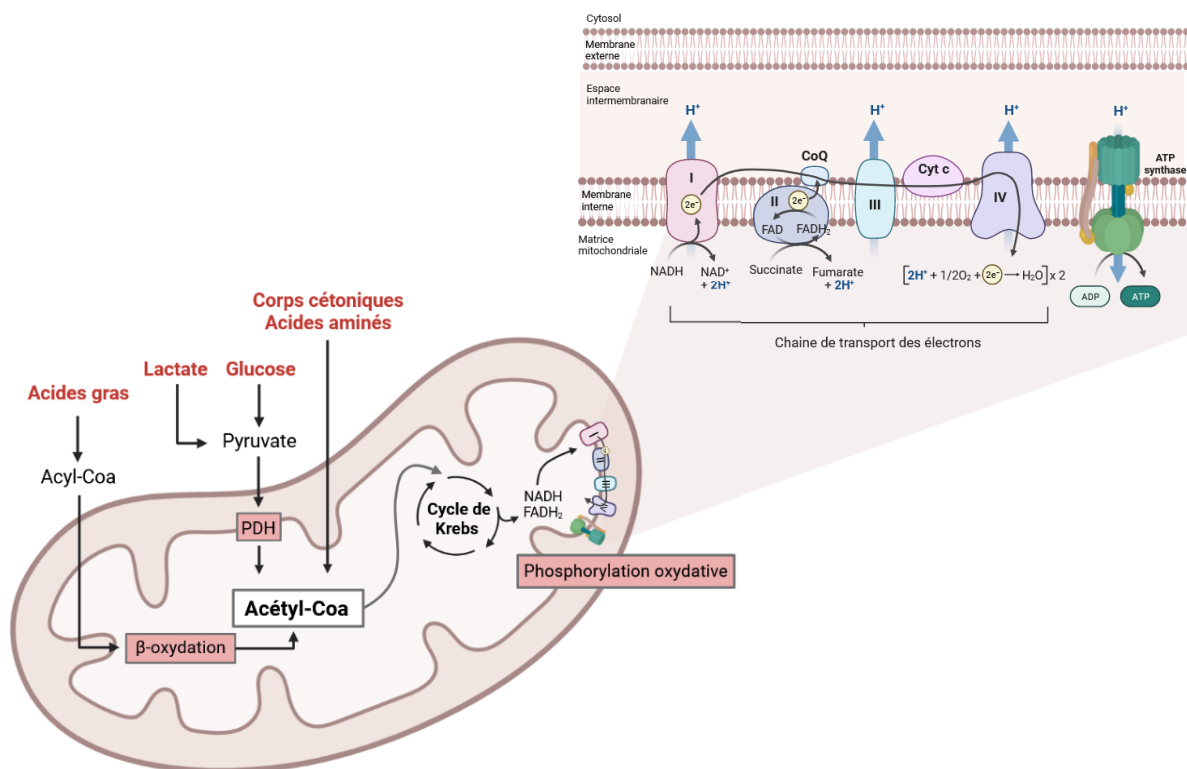


Figure 4 : Représentation schématique des principales voies du métabolisme énergétique mitochondrial

Outre son rôle indispensable dans la fonction énergétique de la mitochondrie, le maintien du gradient électrochimique conditionne l'homéostasie cellulaire tout entière. En effet, il agit comme une force motrice pour l'absorption mitochondriale de protéines, métabolites ou d'ions tels que le Ca<sup>2+</sup> (Giorgi et al., 2012) mais régule également la production d'ERO.

## b. La mitochondrie comme régulateur du statut redox cellulaire

Le statut redox d'une cellule est défini par la balance entre le niveau de production d'ERO et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. À l'état basal, la balance redox est dite à l'équilibre. Les ERO sont des radicaux libres dérivés de l'oxygène possédant un électron célibataire sur leur couche de valence, ce qui leur confère une très forte réactivité avec les molécules environnantes. Parmi les sources cellulaires d'ERO, la mitochondrie est considérée comme l'une des principales dans les myocytes cardiaques (Kohlhaas et al., 2017; Murphy et al., 2016; Nguyen et al., 2019). En condition physiologique, les ERO sont produits en faible quantité par la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, bien que le transport des électrons vers l'accepteur final soit finement régulé, une fraction mineure ( $\approx 0.1\%$ ) des électrons circulants s'échappe de la CTE au niveau des complexes I, II et III et réagit directement avec l' $O_2$  (Murphy et al., 2016). L' $O_2$  moléculaire étant hautement électrophile, cette fuite d'électrons entraîne la formation d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) libéré au niveau de la matrice mitochondriale et dans l'espace intermembranaire. La densité des mitochondries ainsi que l'importance de la phosphorylation oxydative dans les cardiomyocytes peuvent conduire à une surproduction marquée d' $O_2^{\bullet-}$ . Ainsi, afin de maintenir un faible niveau d'ERO la production d' $O_2^{\bullet-}$  est contrebalancée par l'activation de plusieurs enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) responsable de la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), suivie de la catalase et la glutathion peroxydase (GPX) qui vont convertir l' $H_2O_2$  en  $H_2O$ .

Par ailleurs, la CTE n'est pas la seule source d'ERO d'origine mitochondriale (EROMt); en effet la NADPH oxydase 4 (NOX4) ou des enzymes intervenant dans les voies métaboliques telles que l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase et la PDH peuvent également induire une production d' $O_2^{\bullet-}$  et/ou de l' $H_2O_2$  au niveau mitochondrial (Kuroda et al., 2010; Quinlan et al., 2014; Starkov et al., 2004). Étant donné la perméabilité des membranes mitochondriales à l' $H_2O_2$ , les EROMt peuvent diffuser vers le cytosol et participent à des cascades de signalisation non seulement intramitochondriales mais aussi extramitochondriales, régulant ainsi différentes fonctions cellulaires. En effet, bien que les ERO aient longtemps été considérées comme néfastes pour la cellule via leur action directe sur différents composants cellulaires, il a été démontré qu'une production modérée et contrôlée d'ERO est essentielle pour l'homéostasie cellulaire en participant à la régulation de différents processus biologiques. On parle alors de signalisation redox (Schieber & Chandel, 2014; Sena & Chandel, 2012). Les ERO interviennent comme des messagers dans la signalisation cardiomyocytaire, lors de processus tels que le développement et la différenciation cardiaque (Sauer et al., 2000), l'angiogenèse (Zhou et al., 2013), le couplage excitation-contraction (Brennan et al., 2006; Prosser et al., 2011), l'adaptation au signal hypoxique (Chandel et al., 1998) ou encore l'autophagie des cardiomyocytes (Sciarretta et

al., 2013). Par exemple, Prosser et al. (2011) ont rapporté que l'étirement physiologique du cardiomyocyte active la production transitoire d'ERO par la NADPH oxydase 2 (NOX2) au niveau de la membrane plasmique et des tubules T, favorisant la signalisation calcique et la contraction cardiaque chez des cardiomyocytes sains (Prosser et al., 2011). Par contre, il est admis que lorsque la production d'ERO dépasse la capacité antioxydante, on observe un stress oxydant pathologique responsable d'altérations cellulaires. Il est reconnu qu'une surproduction d'ERO peut provoquer l'oxydation, de manière non spécifique et irréversible de protéines, lipides ou ADN, conduisant à des dommages fonctionnels cellulaires. Ce phénomène, visible au cours de l'IR sera détaillé dans le Chapitre 1/ II.2.a. du manuscrit. Cette double potentialité des ERO, peut être expliquée, au moins en partie, par le fait que les réponses cellulaires varient de manière très sensible et très différente en fonction de la nature chimique de l'ERO, de son niveau de production (effet dose-dépendant) ou encore du site producteur.

### **c. Place de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cardiomyocytaire**

#### **i. Homéostasie calcique cardiomyocytaire**

Le couplage excitation-contraction (CEC) correspond aux différents processus cellulaires permettant de transformer l'excitation électrique de la membrane cellulaire (potentiel d'action) en contraction. Le  $Ca^{2+}$  joue un rôle de messenger secondaire central dans ce phénomène permettant de relier la dépolarisation des cardiomyocytes à leur contraction (Bers, 2002). En effet, la dépolarisation de la membrane plasmique pendant la systole déclenche l'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants de type L (LTCC) ou récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) induisant une entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Cette dernière va stimuler le mécanisme de « Calcium-Induced Calcium Release » (CICR) consistant en l'activation, par le  $Ca^{2+}$ , des canaux calciques RyR2 présents au niveau du RS et à la libération massive du  $Ca^{2+}$  du réticulum dans le cytosol. Le RS, en tant qu'organite majeur de stockage du  $Ca^{2+}$ , peut accumuler jusqu'à 1mM de  $Ca^{2+}$  dont la majorité est associée à une molécule tampon à faible affinité et à forte capacité, la calséquestrine de type 2 (CASQ2). Cette citerne calcique intracellulaire joue un rôle majeur dans le CEC puisque l'augmentation de la concentration calcique cytosolique ( $[Ca^{2+}]_c$ ) lors de la systole résulte à 70-90% de la libération de  $Ca^{2+}$  par le RS via les RyR2 (Bers, 2002). Le RyR2, isoforme majoritaire dans le muscle cardiaque, est un homotétramère de 2.2 MDa (4 monomères de 565 kDa) ancré dans la membrane du RS via son domaine C-terminal (Yano et al., 2009) (Figure 5). Le RyR a été initialement identifié à l'aide d'un alcaloïde végétal à haute affinité, la ryanodine, qui lorsqu'elle se lie au RyR à de faibles concentrations bloque le canal dans un état semi-ouvert, entraînant un épuisement du  $Ca^{2+}$  du RS et l'interruption du CEC. D'ailleurs, les extraits de la plante *Ryania speciosa* étaient utilisés par les indigènes d'Amérique du Sud comme poison pour les pointes de flèches, car l'ouverture des RyR de façon stable et permanente induit une libération de  $Ca^{2+}$

du RS continue provoquant la tétanie et la mort (Santulli et al., 2017). Il est admis à ce jour que l'ouverture des RyR est régulée par différents ligands ( $\text{Ca}^{2+}$ , ATP,  $\text{Mg}^{2+}$ , caféine) dont le  $\text{Ca}^{2+}$ , reconnu comme le principal ligand physiologique. La probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) du canal présente une dépendance biphasique au  $\text{Ca}^{2+}$  illustrée par une courbe caractéristique en forme de cloche (Bezprozvanny et al., 1991). En effet, lorsque la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  est faible ( $\sim 100\text{-}200\text{nM}$ ), les canaux RyR2 sont fermés avec une  $P_o$  extrêmement faible. La  $P_o$  augmente à des niveaux submicromolaires de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, atteignant une  $P_o$  maximale à  $\sim 10\text{-}100\mu\text{M}$  alors que des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique supérieures à ces valeurs abaissent la  $P_o$  (Bezprozvanny et al., 1991; Santulli et al., 2018). Ce comportement indique la présence de deux sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  avec des affinités différentes, un site de liaison d'activation du  $\text{Ca}^{2+}$  à affinité modérée ( $1\text{-}10\mu\text{M}$  Kd) et un site d'inhibition dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  à affinité plus faible ( $\sim 100\mu\text{M}$  Kd) (Bezprozvanny et al., 1991; des Georges et al., 2016). Par ailleurs, l'ATP est également un ligand activateur du RyR2 pouvant se fixer sur la boucle cytoplasmique du canal ; contrairement à l'ion magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) qui lui exerce un effet inhibiteur. Il semblerait que le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ATP exercent un effet synergique sur l'activation du RyR ; la  $P_o$  la plus élevée étant atteinte lorsque les deux sont présents (Smith et al., 1986; Xu et al., 1996). Pour finir, les RyR peuvent également s'ouvrir en réponse à des signaux internes grâce à leur capacité à détecter les concentrations calciques dans la lumière du RS. Par exemple, lors d'une surcharge calcique réticulaire, les RyR peuvent s'ouvrir spontanément selon un processus nommé SOICR (store overload-induced calcium release) induisant des vagues calciques incontrôlées et des arythmies ventriculaires (Chen et al., 2014; Jiang et al., 2004).

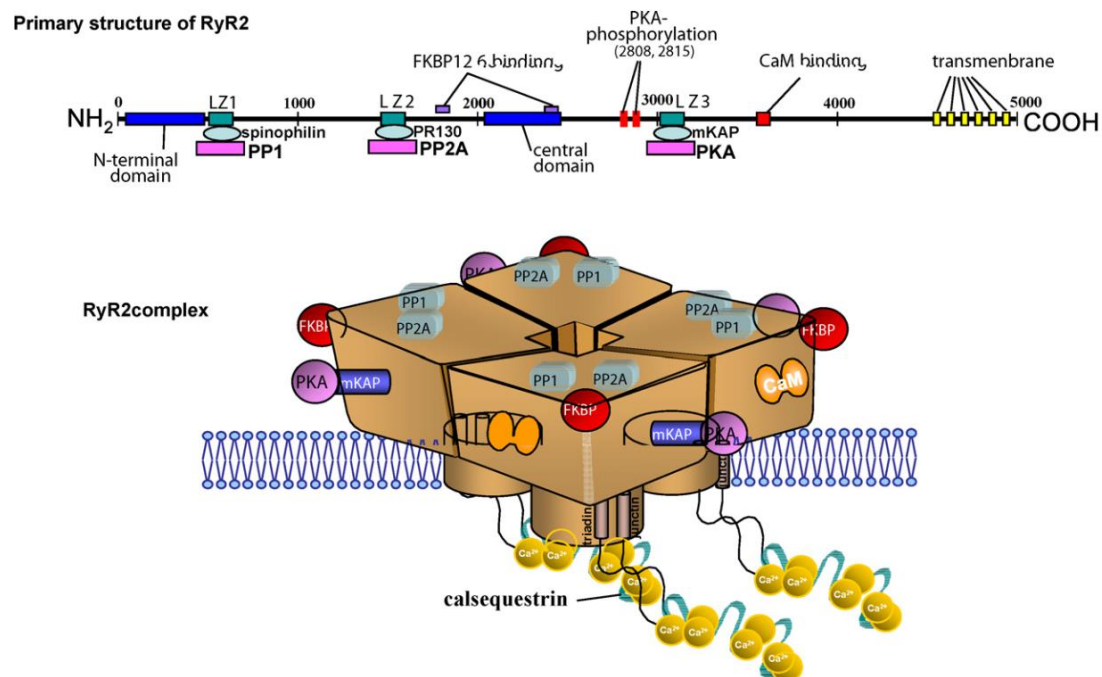


Figure 5 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire formé par le récepteur à la ryanodine 2 (RyR2) et ses protéines régulatrices associées. (Yano et al, 2009).



Bien que le  $\text{Ca}^{2+}$  est le déclencheur principal de l'ouverture des RyR2 au cours du CEC, d'autres éléments participent à la régulation de l'activité du canal tels que des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, oxydation, nitrosylation) ainsi que l'action de nombreuses protéines accessoires capables de se lier au RyR2 et pouvant ainsi moduler la fonction du canal. Des études structurales ont rapporté qu'environ 90 % de la chaîne polypeptidique de RyR2 forme un domaine cytoplasmique volumineux (région N-terminale), zone principale de fixation des protéines régulatrices, tandis que les 10% restants (région C-terminale) forment les segments transmembranaires et la région du pore du canal (Yano et al., 2009; Zalk et al., 2007) (Figure 5). Chaque monomère composant le RyR2 peut interagir avec plusieurs ions et protéines régulatrices formant ainsi un énorme complexe macromoléculaire (Bers, 2004). Ces protéines interagissent, de façon directe ou indirecte, avec le domaine cytoplasmique (FKBP12.6, calmoduline, sorcin, PKA, PP1 et PP2A), ou le domaine luminal (junctine, triadine, CASQ2) du RyR2 modulant ainsi son activité (Figure 5). L'intégrité de leur interaction avec les sous unités du RyR2 joue un rôle déterminant dans la physiologie cardiaque. La calstabilité-2 (ou FKBP12.6), dont la stœchiométrie calstabilité:RyR est de 4:1, est l'une des protéines régulatrices les plus importantes puisqu'elle a pour fonction de stabiliser le canal, notamment en position fermée lors de la diastole (Brillantes et al., 1994; Kaftan et al., 1996) et de faciliter le couplage entre les RyR voisins (Marx et al., 1998). Il a été rapporté que la dissociation de la calstabilité-2 du RyR2 augmente la  $P_o$ , due à une sensibilité accrue à l'activation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , et induit des états de sous-conductance (Brillantes et al., 1994; Marx et al., 2000). Par ailleurs, la calmoduline (CaM) et la sorcine sont deux autres protéines régulatrices de RyR2. Ces protéines à haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  peuvent se fixer directement sur la boucle cytoplasmique de RyR2 et exercent une action inhibitrice sur le canal (Balshaw et al., 2001; Lokuta et al., 1997; Yamaguchi et al., 2003). L'activité du RyR2 est également régulée par la protéine kinase A (PKA) et la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline kinase II (CaMKII) qui peuvent toutes les deux se fixer sur le récepteur. Lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique, l'activation de la PKA suite à l'augmentation de la concentration en adénosine-monophosphate cyclique (AMPC) entraîne la phosphorylation du RyR2. Cette dernière induit la dissociation transitoire de la calstabilité-2 et la suractivation physiologique du canal, essentielle pour assurer une libération plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS et répondre ainsi aux besoins énergétiques accrus du muscle cardiaque (Ginsburg & Bers, 2004; Marx et al., 2000). La sorcine peut être également phosphorylée par la PKA diminuant ainsi son action inhibitrice sur le canal (Lokuta et al., 1997). La phosphorylation du RyR2 par la CaMKII, quant à elle, n'est pas associée à une dissociation de calstabilité-2 mais augmente également la  $P_o$  du RyR2 (de manière plus modérée que la phosphorylation dépendante de la PKA) en réponse à une augmentation du rythme cardiaque (Kushnir et al., 2010; Wehrens et al., 2004). Ainsi, ces mécanismes de réponse au stress « combat ou fuite » (« fight or flight ») permettent d'augmenter rapidement la contractilité et le débit cardiaque pendant l'exercice ou en cas de stress

soudain. Cependant, dans certains cas pathologiques, on observe une hyperphosphorylation chronique du RyR2 par la PKA (Marx et al., 2000; Wehrens et al., 2003) ou la CaMKII (Ai et al., 2005) maintenant le canal dans un état de sous-conductance permanent induisant des fuites calciques diastoliques incontrôlées. Ces dernières sont à l'origine d'arythmies ventriculaires associées à une dysfonction contractile et à un risque de mort subite. De manière intéressante, le développement de nouvelles drogues stabilisatrices du RyR (appelées rycals) visant à augmenter l'affinité de la liaison du RyR2 et de la castalbine-2 permet de prévenir les fuites calciques diastoliques et les arythmies ventriculaires chez des souris déficientes pour la castalbine-2<sup>+/</sup> (Lehnart et al., 2006; Wehrens et al., 2004b) ou chez des modèles d'insuffisance cardiaque induits chez le chien (Yano et al., 2003). En condition physiologique, afin d'éviter la phosphorylation permanente de RyR2, les phosphatases de type 1 (PP1) et 2A (PP2A) et la phosphodiesterase de type 4D3 (PDE4D3) assurent respectivement, la déphosphorylation du RyR2 et la diminution locale de la concentration en AMPc (Lehnart et al., 2005; Marx et al., 2001).

Outre la phosphorylation, le RyR2 est sensible à la S-nitrosylation, qui entraîne une activation du canal (Xu et al., 1998), mais également aux agents oxydants qui peuvent dissocier la CaM (Oda et al., 2015) et la castalbine-2 du RyR (Zissimopoulos et al., 2007). Pour finir, d'importantes régulations s'opèrent également au niveau de la partie luminaire ou intra-RS du RyR2. Cette régulation fait, en particulier, intervenir la protéine à fort pouvoir chélateur du Ca<sup>2+</sup>, la CASQ2, qui permet de maintenir une forte [Ca<sup>2+</sup>] dans le RS. La CASQ2 interagit physiquement avec le RyR2 grâce à deux protéines transmembranaires, la triadine et la junctine liées au site luminal du RyR2 (Zhang et al., 1997). Outre son action de tampon du Ca<sup>2+</sup>, ce complexe jonctionnel participe également à la régulation de l'activité du RyR2 grâce à la détection lumineuse de la [Ca<sup>2+</sup>] par la CASQ2. Il est suggéré qu'une diminution importante de la [Ca<sup>2+</sup>] intra-SR au cours du CICR (40-60% du Ca<sup>2+</sup> luminal) induit une désensibilisation des RyR2 au Ca<sup>2+</sup> du côté cytosolique entraînant leur fermeture (Bers & Shannon, 2013). Cette dernière serait médiée par la CASQ2 via un renforcement de sa liaison avec le complexe junctine/triadine (Györke et al., 2004; Terentyev et al., 2003). L'inhibition des canaux est suivie d'une période réfractaire qui se maintient jusqu'à la reconstitution des stocks calciques du RS par la pompe SERCA (Terentyev et al., 2002). L'inhibition des RyR2 est ensuite levée lorsqu'une forte [Ca<sup>2+</sup>] intra-SR est perçue par la CASQ2 (Györke et al., 2004).

Afin d'optimiser le transfert du signal calcique au cours du CICR, la disposition des composants cellulaires est optimisée et structurée au sein du cardiomyocyte. En effet, dans l'espace dyadique, le RS jonctionnel (RSj ; partie distale du RS contenant les citernes calciques) enveloppe les tubules T de manière à créer une étroite apposition (≈10nm) entre les LTCC et les clusters de RyR2 localisés



préférentiellement au niveau du RSj, permettant d'atteindre des concentrations calciques suffisantes pour déclencher l'ouverture des RyR2 (Bootman et al., 2006; Brochet et al., 2005). De cette façon, la concentration calcique dans l'espace dyadique augmente jusqu'à 100 $\mu$ M (Fearnley et al., 2011) tandis que la concentration dans le cytosol passe de 100nM à environ 0,5-1 $\mu$ M en condition basale et peut atteindre 4 $\mu$ M en situation de stress  $\beta$ -adrénergique (Hamilton et al., 2021). Bien que les LTCC et RyR2 ne soient pas accouplés physiquement dans les myocytes cardiaques, la protéine junctophiline 2 a émergée ces dernières années comme pouvant jouer un rôle majeur au cours du CEC en reliant la membrane plasmique au niveau des tubules T avec celle du RS maintenant les canaux LTCC et RyR2 à une distance fixe, d'environ 12 nm (Beavers et al., 2014). Dans le cœur, chaque fente jonctionnelle située entre un tubule T et les citernes terminales du RS est composée d'un groupe de  $\sim$ 10 à 100 RyR2 et de 10-25 LTCC (Baddeley et al., 2009; Franzini-Armstrong et al., 1999) formant une unité locale de libération de  $Ca^{2+}$  appelée « couplon » (Bers, 2002). Cependant, au cours du CEC, seule une partie des LTCC et des RyR2 au sein d'un même couplon s'ouvre pour libérer le  $Ca^{2+}$  dans l'espace cytoplasmique (Bers, 2002). L'activation synchrone d'environ 6 à 20 RyR2 appartenant à un même cluster repose sur un couplage physique et fonctionnel des RyR2 (de par leur large domaine cytoplasmique), processus appelé « coupled gating » (Marx et al., 2001) qui résulte en une étincelle de  $Ca^{2+}$  appelée « sparks » (Bers, 2004; Bers, 2002). Les étincelles de  $Ca^{2+}$  sont les unités fondamentales de la libération de  $Ca^{2+}$  par le SR, à la fois au repos (événements rares et stochastiques) et pendant le CEC. Au cours de ce dernier, les 10 000 couplons composant un cardiomyocyte sont activés simultanément et indépendamment par l'influx de  $Ca^{2+}$  provenant des LTCC juxtaposés. La relargage massif et synchronisé de plusieurs milliers d'étincelles calciques par le potentiel d'action donne naissance à un transitoire calcique, correspondant à la sommation temporelle et spatiale des augmentations locales de la  $[Ca^{2+}]_c$  le long du cardiomyocyte (Bers, 2002; Cheng & Lederer, 2008). La genèse du transitoire calcique est essentielle pour la fixation du  $Ca^{2+}$  sur la troponine C et la formation des ponts actomyosines au niveau sarcomérique déclenchant ainsi la contraction cardiaque suite à l'hydrolyse d'ATP. Parallèlement, une partie du  $Ca^{2+}$  cytosolique est captée par les mitochondries afin de stimuler les mécanismes de production d'ATP et répondre aux besoins énergétiques du cœur. Ce mécanisme d'activation parallèle dépendant du  $Ca^{2+}$  (consommation d'énergie/régénération d'énergie) permet au cœur de répondre à une charge de travail accrue par une augmentation soutenue de la production d'ATP par la mitochondrie. La relaxation débute lorsque le  $Ca^{2+}$  se détache de la troponine C et qu'il est recapté dans le SR par la pompe SERCA2a localisée principalement au niveau du RS longitudinal (Greenstein & Winslow, 2011). Il a été estimé qu'environ 70% du  $Ca^{2+}$  cytosolique est recapté par SERCA2a pendant la relaxation cardiaque. Le  $Ca^{2+}$  cytosolique restant est extrudé dans le milieu extracellulaire majoritairement par l'échangeur NCX mais également par la PMCA. L'organisation très spécifique des composants cellulaires au sein du cardiomyocyte favorise l'absorption du  $Ca^{2+}$  par les

mitochondries en excluant SERCA2a de la fente dyadique (Fearnley et al., 2011), tout en l'alimentant avec l'ATP dérivé de la mitochondrie (Wilding et al., 2006) et le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par le NCLX dans des zones à proximité des myofilaments (Malli et al., 2005; Rossini & Filadi, 2020).

## ii. Homéostasie calcique mitochondriale

La mitochondrie est maintenant bien reconnue comme étant capable de capter du  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du CEC en parallèle des variations calciques cytosoliques (Dedkova & Blatter, 2008; Rizzuto et al., 1992; Robert et al., 2001). En effet, la CTE crée un gradient électrochimique le long de de la membrane interne mitochondriale qui agit comme une force motrice pour l'absorption mitochondriale de  $\text{Ca}^{2+}$  (Vasington & Murphy, 1962). Ainsi, en condition basale, la concentration calcique mitochondriale ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) est similaire aux valeurs mesurées dans le cytoplasme (100-200nm) ; cependant lors d'une stimulation adrénérgique ou autres situations favorisant l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , les mitochondries accumulent 10 à 20 fois plus de  $\text{Ca}^{2+}$  que le compartiment cytosolique. La capacité de stockage calcique des mitochondries est permise grâce à la présence dans la matrice mitochondriale de phosphate inorganique (Pi), composé requis pour la synthèse d'ATP. La précipitation du  $\text{Ca}^{2+}$  libre en phosphate de calcium permet d'augmenter la capacité de tamponnage du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie (Chalmers & Nicholls, 2003). Par ailleurs, bien que la mitochondrie ait longtemps été considérée comme capable de tamponner une grande quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  pendant le CEC, il a récemment été rapporté que sa contribution dans l'élimination du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique à chaque transitoire semble minime ( $\approx 1\%$ ) en comparaison avec SERCA2a ou NCX1 (Lu et al., 2013; Williams et al., 2013). Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans la modulation de l'amplitude du transitoire calcique (Bertero & Maack, 2018). Ce phénomène semble plutôt servir de signal permettant de synchroniser les changements de la fonction cardiaque à la production d'ATP, afin de répondre aux changements des besoins énergétiques cellulaires (Yaniv et al., 2010). En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  est un activateur de plusieurs enzymes déshydrogénases impliquées dans l'oxydation du pyruvate (PDH) ou dans le cycle de Krebs (isocitrate et  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénases) (Glancy & Balaban, 2012). D'autres études rapportent également une action directe du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la chaîne respiratoire mitochondriale notamment au niveau de l'ATP synthase (Bertero & Maack, 2018; Territo et al., 2000) et possiblement sur le complexe III et IV (Glancy et al., 2013; Murphy et al., 1990). Ainsi, la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale est directement corrélée à la régénération des équivalents réduits (NADH et  $\text{FADH}_2$ ) et à la synthèse d'ATP (Jouaville et al., 1999).

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses recherches ont porté sur l'identification des composants moléculaires régulant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Le consensus actuel est que le  $\text{Ca}^{2+}$  peut facilement diffuser à travers la membrane externe mitochondriale par l'intermédiaire d'un

canal à faible sélectivité et à haute conductance, le canal anionique dépendant du voltage (VDAC). En revanche, la membrane interne mitochondriale étant quant à elle imperméable aux ions, est équipée de différents transporteurs calciques tels que le complexe de l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCUc), qui est reconnu comme la principale voie d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Le MCUc est un canal ionique très sélectif au  $\text{Ca}^{2+}$ , à faible affinité ( $K_m \approx 20\text{-}30\mu\text{M}$ ) mais à haute capacité (De Stefani et al., 2011). C'est un grand complexe multiprotéique de 500-800 kDa, qui comprend la sous-unité principale MCU (30-40kda) qui s'oligomérisent en tétramère pour former un canal fonctionnel, les sous-unités régulatrices MICU1 et MICU2 (mitochondria calcium uptake 1 et 2) et la protéine EMRE (essential MCU regulator). Ce complexe protéique coopère étroitement pour réguler l'absorption mitochondriale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cardiomyocytes. Plus précisément, le cœur du canal est constitué de quatre sous-unités MCU associées à quatre sous-unités EMRE transmembranaires dans un rapport 1:1 (Figure 6). La liaison de EMRE à MCU est essentielle pour stabiliser et maintenir les sous-unités MCU dans une configuration ouverte lors du passage du  $\text{Ca}^{2+}$  (Van Keuren et al., 2020). La protéine EMRE interagit également avec la protéine régulatrice MICU1 et contribue à ancrer MICU1 au complexe MCU (Figure 6). MICU1 et MICU2 forment des hétérodimères qui projettent dans l'espace intermembranaire leurs domaines « main-EF » capables de lier le  $\text{Ca}^{2+}$  de manière coopérative et avec une grande affinité (Csordás et al., 2013; Patron et al., 2014). De part cette capacité à détecter les changements locaux de concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , les protéines MICU1 et MICU2 régulent l'activité du canal MCU d'où leur nom de « gatekeeper ». En effet, elles maintiennent le canal fermé lors de faibles  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , mais favorisent son activation lorsque la concentration calcique augmente ( $>1\mu\text{M}$ ) tel un interrupteur on/off (Kamer et al., 2017). Toutefois, leur contribution respective dans la régulation du MCUc reste encore mal connue. Il a été proposé que lors de faibles  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , MICU2 exercerait un rôle inhibiteur sur l'ouverture du canal (Patron et al., 2014) tandis que MICU1 se lierait physiquement à l'entrée cytoplasmique du pore MCU occluant ainsi l'uniporteur (Fan et al., 2020; Paillard et al., 2018; Phillips et al., 2019). L'élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  dans l'espace intermembranaire induirait l'activation coopérative des « mains-EF » conduisant à un changement de conformation des MICU et au déblocage du canal permettant au  $\text{Ca}^{2+}$  de pénétrer dans la mitochondrie (Fan et al., 2020). En ce sens, l'absence de MICU1 a été associée à une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie lors de faibles élévations de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (condition basale) et à une diminution de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie en réponse à de fortes élévations de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (de la Fuente et al., 2014; Liu et al., 2016; Mallilankaraman et al., 2012). Cela a permis de mettre en évidence que MICU1 fixe non seulement le seuil d'ouverture du MCU ( $\approx 1\mu\text{M}$ ) afin de limiter la surcharge calcique mitochondriale en condition basale mais coopère également pour activer l'ouverture du canal lors d'une  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  élevée pour répondre aux besoins énergétiques (Csordás et al., 2013). Pour finir, d'autres membres appartenant au complexe MCU tels que MCUb (un paralogue dominant-négatif de MCU pouvant s'incorporer dans le canal par le biais d'un

mécanisme cellulaire sensible au stress) mais également MCUR1 (mitochondrial calcium uniporter regulator1 ; essentiel pour l'association des tétramères de MCU) ou SLC25A23 (Solute Carrier Family 25 Member 23) ont été identifiés comme des modulateurs de l'activité globale du MCU mais leur rôle pour certains est encore inconnu et promet une complexification de la régulation calcique mitochondriale.

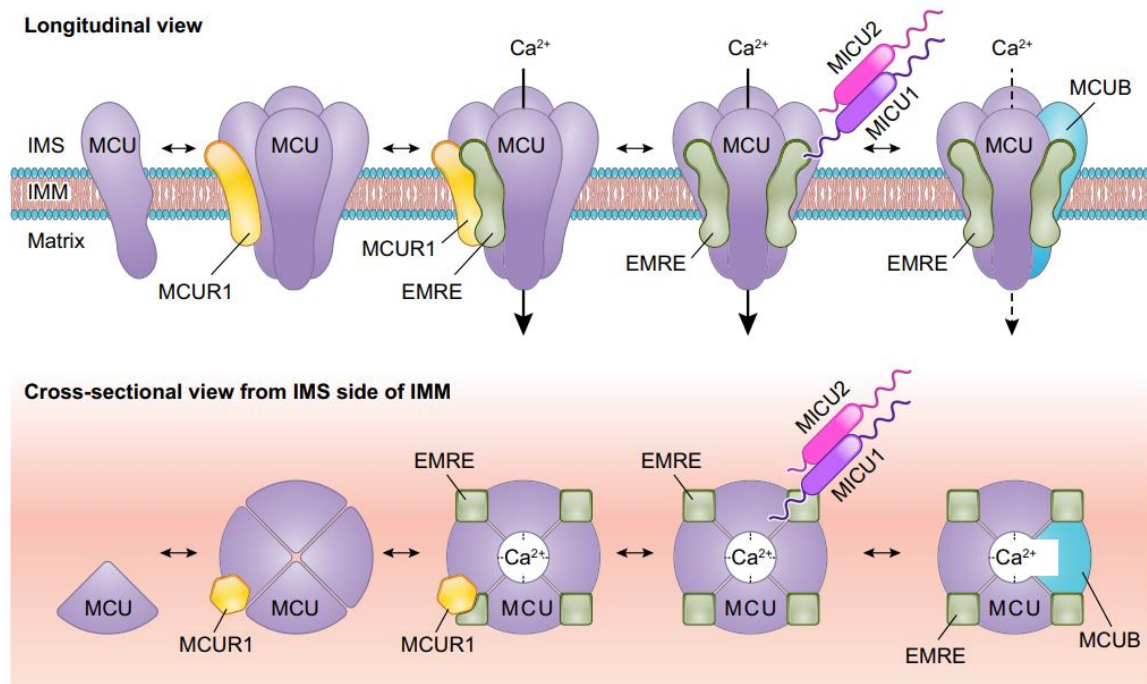


Figure 6 : Représentation schématique de l'assemblage moléculaire et de la stœchiométrie de l'uniporteur calcique mitochondrial (MCU) (Garbincius et Elrod, 2022)

De manière intéressante, il est admis que l'activité du MCU est 25 à 30 fois plus faible dans le cœur que dans d'autres tissus, y compris le muscle squelettique (Fieni et al., 2012). Cette activité réduite peut être expliquée par des différences de stœchiométrie résultant en un ratio MCUB:MCU plus élevé (1:3 dans le cœur contre 1:40 dans le muscle squelettique) et un ratio MICU1:MCU plus faible dans le cœur (Paillard et al., 2017; Raffaello et al., 2013). Ces caractéristiques spécifiques cardiaques pourraient contribuer à prévenir la surcharge calcique mitochondriale dans les cardiomyocytes, cellules soumises à de fréquentes et importantes élévations du Ca<sup>2+</sup> cytosolique.

Par ailleurs, le complexe MCU est la principale mais non la seule voie de transport du Ca<sup>2+</sup> dans les mitochondries. En effet, un mécanisme rapide d'absorption du Ca<sup>2+</sup> appelé RaM (Rapid Uptake mode) a été décrit sur mitochondries cardiaques isolées (Buntinas et al., 2001) mais son identité moléculaire reste encore inconnue. Ce mécanisme fonctionnerait à des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> inférieures à 200nM, (là où le MCUc n'est pas activé) et permettrait de séquestrer très rapidement du Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie mais ce uniquement au début de chaque impulsion calcique. Par ailleurs, dans les

mitochondries cardiaques, le RaM aurait besoin de plus de 30 sec pour réactiver complètement sa conductivité calcique et ne pourrait donc pas être responsable de l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial d'un battement à l'autre (Maack & O'Rourke, 2007). Certaines études suggèrent que ce mécanisme pourrait être assuré par le MCU, qui présenterait deux modes différents d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  tandis que d'autres rapportent que le RaM serait médié par un autre canal indépendant (Bertero & Maack, 2018). En ce sens, des études ont également rapporté la présence d'un RyR1 au niveau de la membrane interne des mitochondries cardiaques, qui s'activerait à faible  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Beutner et al., 2001, 2005) mais son importance physiologique reste à investiguer. D'autres protéines telles que l'antiporteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  nommé LETM1 (Leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1), ou encore les protéines découplantes UCP2 et UCP3 (uncoupling proteins 2 & 3) pourraient également contribuer à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie (Waldeck-Weiermair et al., 2011).

Alors qu'il était accepté que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie par le MCUc était essentielle pour assurer la production d'ATP au cours du CEC, de récentes études ont remis en question ce dogme scientifique. En particulier, trois modèles de souris déficientes en MCU présentant soit une délétion globale du gène MCU (Pan et al., 2013), une délétion inductible spécifiquement cardiaque (Kwong et al., 2015; Luongo et al., 2015) ou une délétion cardiaque par expression transgénique d'un dominant négatif du MCU (Wu et al., 2015) ont fourni des modèles uniques pour étudier l'importance du MCU dans la physiologie cardiaque. Dans les trois modèles une incapacité à capter rapidement le  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries cardiaques a été rapportée mais étonnamment la concentration calcique matricielle mitochondriale est inchangée et les souris déficientes en MCU présentent une fonction cardiaque normale au repos suggérant un rôle non essentiel du MCU dans le CEC en condition basale. En revanche, lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique, une incapacité à stimuler les déshydrogénases mitochondriales ainsi qu'une réduction de la réactivité contractile a été observée (Luongo et al., 2015) suggérant que le MCU est nécessaire uniquement lors d'augmentations aiguës de la charge de travail cardiaque. De manière intéressante, les souris délétées pour MCU sont incapables de sprinter immédiatement sur un tapis roulant, à moins d'avoir été échauffées pendant 30 minutes au préalable (Kwong et al., 2015) suggérant que le MCU est essentiel pour faire correspondre de manière rapide la production d'ATP à la charge de travail cardiaque lors d'un stress aigu de type « Fight or Flight ». En adéquation avec ce résultat, Wu et al (2015) ont rapporté que le MCU joue un rôle majeur dans l'augmentation de la fréquence cardiaque lors d'une situation de « combat ou fuite », notamment en augmentant rapidement la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  dans les cellules pacemaker. Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que le MCU ne serait pas essentiel au CEC physiologique mais qu'il serait spécifiquement requis pour les augmentations aiguës de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , afin d'accélérer le rendement métabolique et répondre à la demande contractile accrue du cœur. Pour finir, l'absence d'altérations cardiaques chez les souris

dépourvues de MCU en condition basale est assez surprenante mais peut être expliquée par une potentielle compensation par les autres voies d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Par exemple, il a été rapporté qu'en réponse à un stress  $\beta$ -adrénergique à l'isoprotérénol, le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par les RyR2 pénètre dans la mitochondrie par le MCU ; cependant ce dernier ne semble pas impliqué dans l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à la stimulation des IP3R. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré par les IP3R semble entrer rapidement dans la mitochondrie par le RyR1, augmentant la teneur en ATP sans pour autant stimuler la production d'EROmt (Seidlmayer et al., 2016).

Pour finir, concernant les mécanismes responsables de la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie, une forme spécifique de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , appelé échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$  (NCLX), responsable d'extruder 1  $\text{Ca}^{2+}$  en échange de 3  $\text{Na}^+$  ou 3  $\text{Li}^+$  a été rapporté comme la voie d'extrusion calcique principale dans les mitochondries cardiaques (Palty et al., 2010). Dans le cœur, la fraction de l'efflux calcique dépendante du NCLX par rapport à l'efflux total mitochondrial est de 60 à 100% selon l'espèce et les conditions expérimentales (Takeuchi & Matsuoka, 2021). La fraction restante semble médiée par l'échangeur mitochondrial  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mHCX) qui extrude 1 $\text{Ca}^{2+}$  pour 2 $\text{H}^+$  (Rottenberg & Marbach, 1990), bien que sa contribution dans le cœur soit controversée. Pour finir, il a été émis l'hypothèse que l'ouverture transitoire du mPTP, dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , pourrait prévenir la surcharge calcique en fournissant aux mitochondries un canal de libération rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  (Bernardi & von Stockum, 2012; Petronilli et al., 1999). De manière intéressante, alors que l'absence de MCU n'altère pas la fonction cardiaque en condition basale, l'absence du NCLX a des conséquences drastiques sur le cœur. En effet, la délétion cardiaque du NCLX, induite par le tamoxifène, induit une léthalité accrue en raison d'un remodelage cardiaque sévère attribué à une surcharge calcique mitochondriale, une production accrue d'ERO et l'ouverture du mPTP (Luongo et al., 2017). Ces résultats suggèrent que la surcharge calcique mitochondriale pourrait être beaucoup plus délétère pour le cœur que la déplétion en  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **iii. Importance de l'interaction mitochondrie-réticulum dans l'homéostasie calcique mitochondriale**

Au cours des dernières décennies, le développement des indicateurs calciques codés génétiquement a permis de pallier aux difficultés rencontrées avec les sondes calciques fluorescentes standards (contamination du signal mitochondrial par l'indicateur cytosolique) et ainsi de mesurer plus précisément les transitoires calciques mitochondriaux en parallèle des transitoires cytosoliques. Cette avancée a permis d'éclaircir la controverse existante sur le sujet, consistant à savoir si, pendant le CEC les mitochondries cardiaques absorbent le  $\text{Ca}^{2+}$ , battement par battement, de façon rapide et synchrone avec les oscillations calciques cytosoliques ou plutôt lentement en accumulant le  $\text{Ca}^{2+}$  graduellement par intégration des signaux cytosoliques sur plusieurs battements (Bertero & Maack,



2018; De la Fuente & Sheu, 2019; Dedkova & Blatter, 2008). Le consensus actuel est que la  $[Ca^{2+}]_m$  augmente rapidement et de façon synchrone à la  $[Ca^{2+}]_c$  lors d'une stimulation électrique (Maack et al., 2006; Robert, 2001) mais que la décroissance des transitoires mitochondriaux est considérablement plus lente que celle des transitoires cytosoliques (Andrienko et al., 2009; Bell et al., 2006) due à une cinétique plus lente du NCLX comparé aux activités de SERCA2a et du NCX sarcolemmal. Par conséquent, lors d'une stimulation électrique à haute fréquence cette asymétrie induit une accumulation progressive du  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie (Hamilton et al., 2021; Lu et al., 2013) (Figure 7). L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$  dépend principalement de l'amplitude des transitoires et de la fréquence de stimulation (Maack et al., 2006) et cette dernière peut atteindre jusqu'à  $4\mu M$  lorsque les cardiomyocytes sont exposés à une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Hamilton et al., 2021; Lu et al., 2013). De manière intéressante, Maack et al. ont observé sur cardiomyocytes isolés suite à un stress  $\beta$  adrénérgique à l'isoprotérénol, un pic de  $[Ca^{2+}]_m$  plus précoce par rapport au pic de  $[Ca^{2+}]_c$  suggérant que les mitochondries peuvent détecter plus précocement l'augmentation du  $Ca^{2+}$  (Maack et al., 2006).

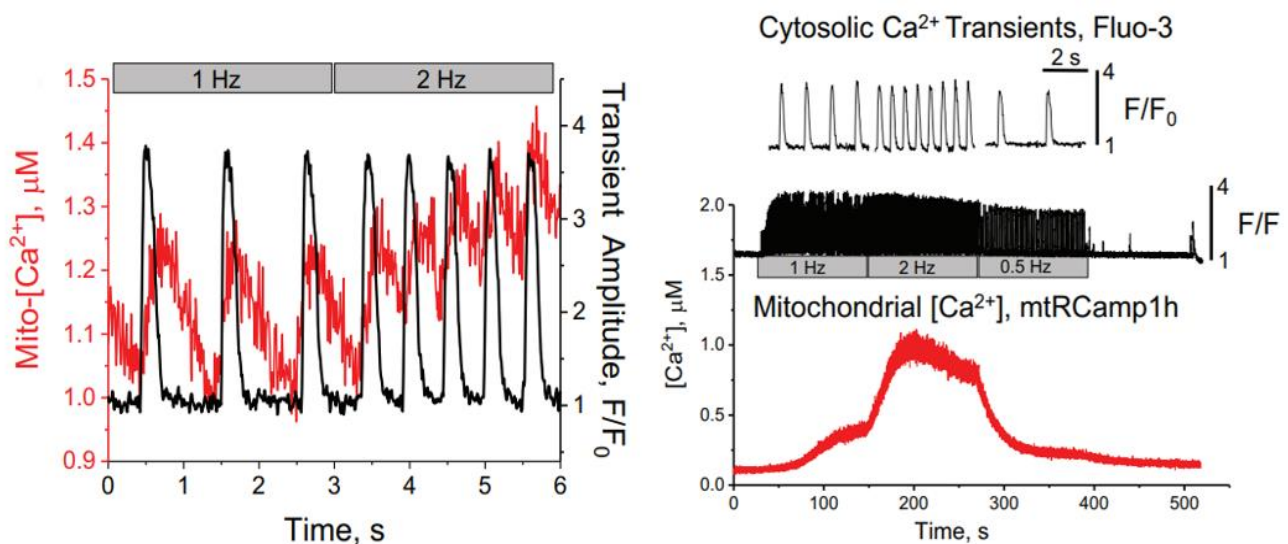


Figure 7 : Enregistrement simultané des oscillations calciques cytosoliques et mitochondriales cardiomyocytaires en réponse à une stimulation électrique (Hamilton et al, 2021)

Comme expliqué précédemment, le MCUc a une très faible affinité pour le  $Ca^{2+}$  ( $K_m \approx 20-30\mu M$  dans des conditions physiologiques), ainsi la concentration calcique à proximité du transporteur doit être  $\approx 2-5\mu M$  pour assurer une absorption convenable du  $Ca^{2+}$  (Hamilton et al., 2021). Cependant, cette concentration n'est pas atteinte dans le cytosol des cardiomyocytes lors des cycles de contraction-relaxation ( $[Ca^{2+}]_c$  en systole  $\approx 500nM$  en condition basale /  $1-4\mu M$  en condition de stress adrénérgique). Cette incohérence a été clarifiée, il y a maintenant plus de 2 décennies, par l'observation en microscopie électronique d'une proximité structurale entre les mitochondries

cardiaques et les citernes terminales du RS (Ramesh et al., 1998; Sharma et al., n.d.). Cette apposition étroite ( $\approx 40\text{nm}$ ) permet d'atteindre des concentrations calciques au sein de ces microdomaines 5 à 20 fois supérieures aux valeurs moyennes cytosoliques lors de la systole (Garbincius & Elrod, 2022), permettant ainsi de surmonter l'affinité relativement faible du MCUc pour le  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les points de contact entre la mitochondrie et le réticulum, appelés « mitochondria-associated membranes » (MAMs) ont été décrits dans de nombreux types cellulaires et ont été rapportés comme jouant un rôle dans la synthèse et le transfert des lipides, la dynamique mitochondriale, l'inflammation, la génération d'ERO, la régulation de l'autophagie et de l'apoptose mais également le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gao et al., 2020; Lopez-Crisosto et al., 2017). Il a été évalué qu'environ 5 à 20% de la surface mitochondriale était en apposition étroite avec le réticulum (Rizzuto et al., 1998) et que la distance les séparant était de  $\approx 10$  à  $25\text{nm}$  (Csordás et al., 2006). Les MAMs sont maintenues par des liaisons protéiques, plus ou moins bien décrites, telles que les mitofusines (Mfn), le complexe VAPB-PTPIP51 (Stoica et al., 2014) ou encore FUNDC1-IP3R2 (Wu et al., 2017). Il est admis que la protéine Mfn2 localisée à la surface du réticulum forme un dimère avec Mfn1 ou Mfn2 située au niveau de la membrane externe mitochondriale créant ainsi une interaction physique entre les deux organites (de Brito & Scorrano, 2008). Les MAMs forment ainsi des microdomaines fonctionnels, reconnus notamment comme des plateformes d'échange calcique jouant un rôle crucial dans la régulation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et l'homéostasie calcique cellulaire. Dans le cœur, il a été rapporté que la liaison protéique formée par Mfn2 est essentielle pour la communication calcique mitochondrie-RS, notamment pour adapter la production d'ATP mitochondriale à la demande énergétique lors d'une augmentation aigue du travail cardiaque. En effet, la délétion spécifique cardiaque de Mfn2 chez la souris induit une augmentation de la distance RS-mitochondries et une diminution de la surface des interactions (Beikoghli Kalkhoran et al., 2017), associées à une diminution de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et de l'activation des déshydrogénases du cycle de Krebs lors d'une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Chen et al., 2012). Par ailleurs, parmi les complexes protéiques assurant le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum vers la mitochondrie, le plus décrit est celui comprenant l'IP3R, le pore VDAC et la protéine chaperonne Grp75 qui lie les deux canaux calciques entre eux par leur portion cytosolique (Szabadkai et al., 2006). Cependant, dans les cellules excitables telles que les cardiomyocytes, la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RS pendant le CEC est majoritairement attribuée au RyR2 en comparaison avec IP3R (García-Pérez et al., 2008). En effet, au niveau cardiaque, la quantité d'ARNm de RyR est 50 fois plus élevée que celle d'IP3R (Moschella & Marks, 1993) et les cinétiques de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par les IP3R sont trop lentes, comparées à celles de RyR2, pour contribuer aux transitoires calciques pendant le CEC (Santulli et al., 2017). De plus, les flux calciques médiés par RyR sont beaucoup plus importants que ceux d'IP3R (Zima & Blatter, 2004). Ainsi, l'ensemble de ces



observations ont fait émerger l'idée d'un potentiel rôle du RyR2 au sein des MAMs. En ce sens, des études récentes ont rapporté une localisation préférentielle du RyR2 à proximité des mitochondries (Eisner et al., 2013; Sharma et al., n.d.) voire même sa présence au niveau des MAMs (Chen et al., 2012) où il formerait un complexe avec VDAC2 (Min et al., 2012), suggérant ainsi que le RyR2 pourrait constituer l'acteur majeur de la communication calcique au sein des MAMs cardiomyocytaires. Toutefois, l'interaction physique entre le RyR2 et un composant de la membrane externe mitochondriale est assez controversée, notamment due à des incohérences en termes d'organisation spatiale au sein du cardiomyocyte. En effet, il est admis que les mitochondries sont stratégiquement juxtaposées au RSj afin d'être à proximité des sites de libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par les clusters de RyR2 ( $\approx 35\text{-}40\text{nm}$ ) (Sharma et al., n.d.). Cependant, les mitochondries étant exclues des fentes dyadiques, elles sont accolées au RSj du côté opposé, impliquant que le  $\text{Ca}^{2+}$  doit diffuser autour des citernes du RSj pour atteindre la mitochondrie (Eisner et al., 2013; Rossini & Filadi, 2020). Cette disposition mitochondrie-RSj rend ainsi difficile l'idée d'une interaction physique entre RyR2 et un composant de la membrane externe mitochondriale (Figure 8). Cette divergence pourrait être expliquée par des dispositions structurelles différentes des MAMs selon la localisation des mitochondries (subsarcolemmales ou intermyofibrillaires) (Figure 8). En effet, Min et al., (2012) ont observé un couplage RyR2-VDAC2 uniquement chez les mitochondries subsarcolemmales. Cette sous-population de mitochondries étant beaucoup moins susceptibles d'être à proximité des tubules T, on peut supposer que les RyR2 font directement face à la membrane externe mitochondriale dans cette sous-population de mitochondries. D'ailleurs, cela pourrait expliquer que les mitochondries subsarcolemmales soient plus sensibles à la surcharge calcique que les mitochondries intermyofibrillaires (Holmuhamedov et al., 2012). Pour finir, il a été rapporté que les MCUc au sein de la membrane interne mitochondriale étaient stratégiquement positionnés au niveau de zones juxtaposées avec le jRS contrairement au NCLX qui lui est exclu de ces régions (De La Fuente et al., 2016, 2018). Le fait que l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'extrusion de  $\text{Ca}^{2+}$  soient physiquement réparties dans deux régions séparées contribuerait à améliorer l'efficacité du couplage excitation-bioénergétique (Figure 8).

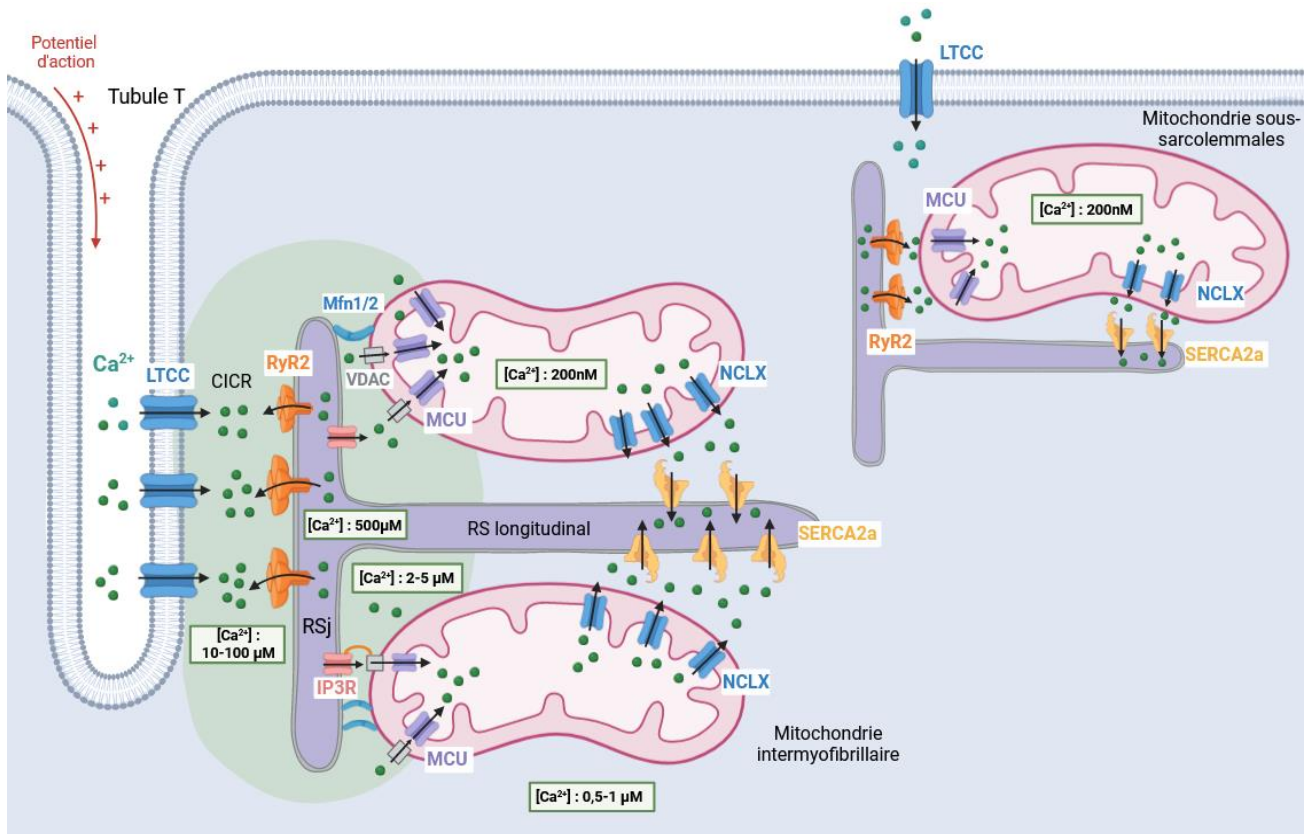


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation structurale de l'interaction mitochondrie-réticulum au sein du cardiomyocyte adulte

#### d. Dynamique mitochondriale cardiomyocytaire : mythe ou réalité ?

Bien que les mitochondries aient longtemps été considérées comme des organites statiques, il est maintenant bien reconnu qu'il existe un remodelage constant du réseau mitochondrial au sein de la cellule. L'expression "dynamique mitochondriale" est utilisée pour décrire à la fois (i) les changements de morphologie des mitochondries par le biais d'événements de fusion et de fission, (ii) leur capacité à interagir avec d'autres structures subcellulaires via leur transport le long du cytosquelette, mais également (iii) le remodelage structurel de la membrane interne mitochondriale (Giacomello et al., 2020; Quintana-Cabrera & Scorrano, 2023). Ces changements structurels constants des mitochondries impactent directement leur activité et expliquent ainsi la polyvalence fonctionnelle des mitochondries. Dans la suite du manuscrit, nous développerons particulièrement les mécanismes impliqués dans la fission et la fusion des mitochondries ainsi que leur rôle au niveau cardiomyocytaire. Les autres aspects de la dynamique mitochondriale, ne constituant pas un point central dans le travail de thèse, seront uniquement abordés brièvement.

La mitochondrie est décrite comme un organe dynamique pouvant interagir avec de nombreux composants subcellulaires tels que le réticulum endoplasmique (RE), les lysosomes, les peroxysomes, les endosomes mais également la membrane plasmique. Au niveau cardiomyocytaire, les mitochondries sont en contact avec le RS plus que tout autre organe de la cellule et cette interaction, développée précédemment (Chapitre 1/II.1.c.iii), est largement reconnue comme participant à l'homéostasie cellulaire en permettant une communication privilégiée entre les deux organites. Il a été estimé que dans les cellules où le cycle calcique est très sollicité, telles que les cardiomyocytes, plus de 97% des mitochondries sont en contact étroit avec le RS (Bleck et al., 2018). Cette interaction permet l'échange de  $Ca^{2+}$  et de lipides mais également d'ATP (Kaasik et al., 2001; Wilding et al., 2006) et d'ERO (Davidson & Duchon, 2006; Ruiz-Meana et al., 2010) au sein de microdomaines cellulaires. Plus récemment, l'interaction mitochondrie-réticulum a également été rapporté comme nécessaire pour induire la constriction de la membrane mitochondriale lors du processus de fission (Friedman et al., 2011). Ce mécanisme sera détaillé dans la suite du manuscrit (Chapitre 1/ II. 1.d.ii). Par ailleurs, l'interaction entre la mitochondrie et les autres composants cellulaires a été très peu étudiée chez des cardiomyocytes adultes et son importance physiologique reste à investiguer.

Pour finir, le dernier aspect de la dynamique mitochondriale fait référence au remodelage des crêtes mitochondriales ou « cristae », correspondant aux replis de la membrane interne des mitochondries. Les cristae sont des structures dynamiques qui adaptent leur architecture en réponse à des facteurs physiologiques ou pathologiques, notamment grâce au complexe protéique MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) impliqué dans les changements de courbures des crêtes. Il a été rapporté qu'une demande bioénergétique accrue entraîne un resserrement des cristae alors qu'un stimulus apoptotique entraîne l'élargissement des crêtes mitochondriales afin de maximiser la libération du cytochrome c vers l'espace intermembranaire puis sa libération dans le cytosol (Quintana-Cabrera & Scorrano, 2023). Ainsi, la dynamique des crêtes mitochondriales semble jouer un rôle majeur dans la fonction mitochondriale.

### **i. Rôle de la fission et fusion mitochondriale**

Les mitochondries, du grec mitos (fil) et chondros (grain) ont été identifiées il y a plus de cent ans par microscopie photonique et nommées ainsi de par l'hétérogénéité de leur morphologie (Sauvanet et al., 2010). En effet, les mitochondries peuvent se présenter sous forme d'organites isolés ou de réseaux interconnectés plus vastes. Ces changements morphologiques dynamiques des mitochondries résultent de cycles de fusion ou fission des mitochondries, indispensables pour l'homéostasie mitochondriale et cellulaire. La fusion mitochondriale, régulée notamment par les

protéines Mfn1, Mfn2 et OPA1 (Optic atrophy type 1) implique que deux mitochondries fusionnent pour générer une mitochondrie plus grande tandis que la fission mitochondriale, médiée principalement par la protéine Drp1, correspond à la scission d'une mitochondrie pour générer des organites plus petits.

La fusion a pour rôle de permettre aux mitochondries de partager leur contenu intra-mitochondrial (métabolites, protéines, lipides, ADN) afin de maintenir une uniformité génétique et biochimique (Figure 9). Ce processus limite l'accumulation de lésions protéiques et de mutations dans l'ADN mitochondrial, notamment dues aux ERO, et optimise ainsi la fonction mitochondriale (El-Hattab et al., 2018; Westermann, 2012). En effet, il a été rapporté que les mitochondries fusionnées présentent une augmentation de la phosphorylation oxydative et de la synthèse d'ATP (Breitzig et al., 2018; Youle & van der Bliek, 2012) et leur proportion est augmentée lors de conditions de forte demande énergétique ou de stress cellulaire (Tondera et al., 2009; Yao et al., 2019). Cependant, cela ne semble pas s'appliquer à tous les types cellulaires. En effet, Coronado et al., (2018) ont rapporté que lors d'un exercice physique, l'augmentation de la fission mitochondriale au niveau cardiaque était une adaptation physiologique normale pour réponse à l'augmentation de la demande énergétique. Par ailleurs, les longs réseaux mitochondriaux pourraient agir comme des systèmes électriquement unis favorisant la transmission du  $\Delta\Psi_m$  (Figure 9), ce qui est particulièrement important pour les grandes cellules ayant une demande énergétique élevée (Skulachev, 2001; Westermann, 2010). De manière intéressante, la délétion conditionnelle de Mfn1 et Mfn2 dans le muscle squelettique induit des dysfonctions mitochondriales caractérisées par une accumulation de mutations ponctuelles dans le génome mitochondrial, associée à une réduction de la capacité respiratoire mitochondriale et à une atrophie musculaire (Chen et al., 2010). L'importance de la fusion mitochondriale au niveau cardiaque a également été mise en évidence par la délétion combinée de Mfn1 et Mfn2 dans le cœur de souris adultes (Chen et al., 2011). Dans cette étude, l'augmentation de la fission mitochondriale s'accompagne d'une dysfonction respiratoire mitochondriale et cardiomyocytaire menant rapidement à une cardiomyopathie dilatée léthale. Ainsi, bien que les mitochondries cardiomyocytaires soient décrites comme hypodynamiques et majoritairement fissionnées (Dorn & Kitsis, 2015; Song & Dorn, 2015), la fusion mitochondriale apparaît comme essentielle pour l'homéostasie cardiaque (Chen et al., 2011).

La fission mitochondriale quant à elle assure la biogenèse mitochondriale, essentielle pour maintenir un nombre adéquat de mitochondries au sein de la cellule (Figure 9). Elle est notamment indispensable chez les cellules prolifératrices pour répliquer les mitochondries au cours de la division cellulaire afin de s'assurer que les cellules filles contiennent autant de mitochondries que la cellule

mère (Quiles & Gustafsson, 2022; Westermann, 2010). De plus, un autre rôle majeur de la fission est de séparer les mitochondries endommagées et dysfonctionnelles du réseau mitochondrial sain afin qu'elles soient dégradées par mitophagie, processus correspondant à la dégradation par autophagie des mitochondries (Figure 9). Il a été rapporté que la division mitochondriale est à l'origine dans certains cas de deux mitochondries filles, l'une de grande taille présentant un  $\Delta\Psi_m$  élevé et l'autre plus petite avec un  $\Delta\Psi_m$  faible, suggérant que la fission représente un « test de stress » qui pousserait une mitochondrie fille à se dépolariser complètement si elle ne fonctionne pas de manière optimale (Twig et al., 2008). De manière intéressante, la mitochondrie dépolarisée présente une expression réduite de la protéine de fusion mitochondriale OPA1, la rendant moins susceptible de fusionner à nouveau avec le réseau mitochondrial et la vouant donc à une élimination par mitophagie (Twig et al., 2008). Ainsi, lorsque qu'une mitochondrie présente des dommages dépassant un niveau critique, on observe une fission asymétrique permettant d'isoler la partie endommagée afin qu'elle soit éliminée par les lysosomes. Ce mécanisme de contrôle de la qualité des mitochondries permet de maintenir une population mitochondriale saine et une capacité bioénergétique élevée. Par ailleurs, la délétion post-natale de Drp1 au niveau cardiaque chez la souris inhibe l'autophagie mitochondriale induisant une accumulation de mitochondries défectueuses associée à une dysfonction cardiaque léthale au bout de 13 semaines (Ikeda et al., 2015; Song et al., 2015). Ainsi, la fission joue un rôle double en induisant soit la biogénèse de nouvelles mitochondries saines soit l'élimination de mitochondries défectueuses. Récemment une étude a rapporté l'existence de deux signatures distinctes de fission permettant de prédire le destin de la mitochondrie. En effet, la division asymétrique de la mitochondrie (fission périphérique) serait précédée d'une diminution du  $\Delta\Psi_m$  et d'une augmentation d'ERO et de  $Ca^{2+}$  au niveau mitochondrial ce qui vouerait la mitochondrie à l'autophagie alors que la fission symétrique (fission médiane) conduirait à la prolifération mitochondriale (Kleele et al., 2021). De plus, la fission médiane nécessiterait l'interaction entre le réticulum et la mitochondrie pour initier la constriction membranaire tandis que la fission périphérique serait précédée par un contact avec les lysosomes. Ainsi, ces mécanismes moléculaires distincts pourraient expliquer comment les cellules régulent la fission de manière indépendante, conduisant à des destins mitochondriaux différents. Par ailleurs, concernant les autres rôles de la fission, plusieurs études ont rapporté qu'elle jouerait un rôle fondamental dans le processus apoptotique en impactant la libération du cytochrome c médiée par Bax (Bcl-2-associated X) (Frank et al., 2001; Suen et al., 2008) (Figure 9). De plus, tout comme la fusion, la fission semble également intimement liée à la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP et semble affectée par les changements métaboliques (Quiles & Gustafsson, 2022). Des études ont rapporté que l'inhibition ou l'ablation de DRP1 sur cardiomyocytes isolés ou sur modèle murin est associée à une diminution de la respiration mitochondriale et à une dysfonction des mitochondries (Aishwarya et al., 2020; Ikeda et al., 2015; Ishihara et al., 2015). De manière intéressante, en plus de

contribuer à la respiration basale dans les cardiomyocytes, la fission mitochondriale est cruciale dans le cœur pour augmenter la capacité respiratoire mitochondriale en réponse à une demande énergétique accrue lors d'un exercice physique (Coronado et al., 2018). Pour finir, la fission en générant des mitochondries plus petites, faciliterait également le transport et la redistribution des mitochondries dans la cellule, vers des zones à haute demande énergétique (Figure 9).

Ainsi, les cycles de fusion et fission permettent au réseau mitochondrial de s'adapter rapidement aux changements de l'environnement et aux besoins de la cellule afin de maintenir l'homéostasie métabolique cellulaire.

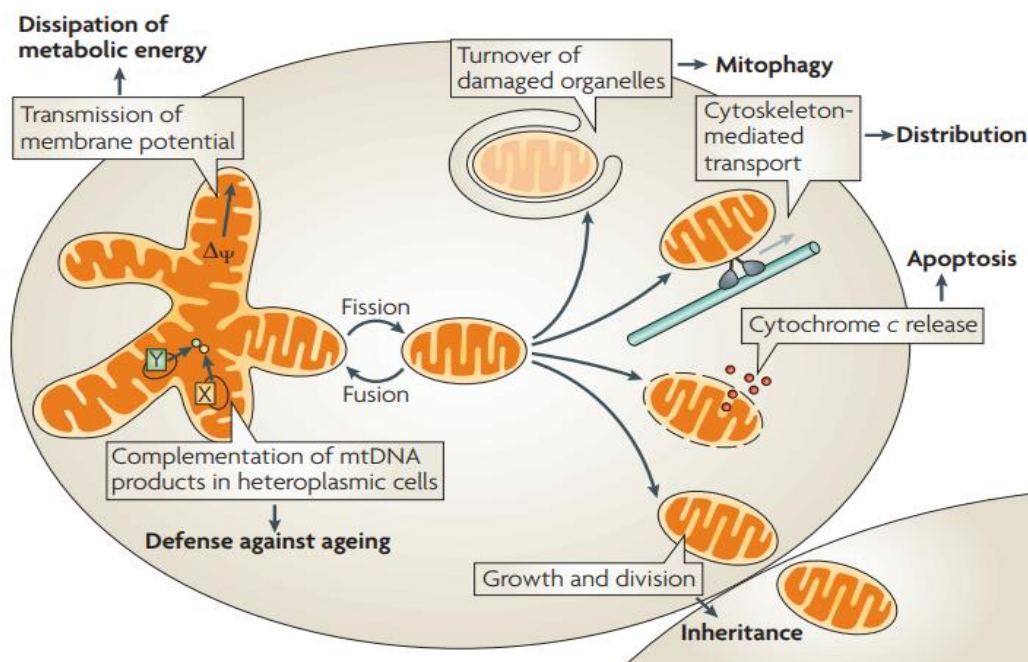


Figure 9 : Rôles et conséquences biologiques de la fusion et fission mitochondriale (Westermann et al, 2010)

Au niveau cardiaque, les mitochondries ont pendant longtemps été considérées comme des organites statiques et hypodynamiques, face à l'absence de preuves directes de fusion ou de fission mitochondriale dans les cardiomyocytes adultes, dues notamment à des limites techniques (Li et al., 2020; Song & Dorn, 2015). Par ailleurs, l'arrangement cellulaire des mitochondries, confinées dans un espace étroit entre les myofibrilles, suggère fortement une mobilité réduite au sein du cardiomyocyte. Cependant, l'expression importante au niveau cardiaque de protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale ainsi que l'altération fonctionnelle après manipulation génétique de l'expression de Drp1 ou Mfn1/2 dans le cœur suggèrent l'existence et l'importance de la dynamique mitochondriale dans la physiologie cardiaque (Dorn et al., 2015). Récemment, grâce à la transduction in vivo d'une protéine fluorescente (GFP) photoactivable et ciblant la matrice mitochondriale, Eisner et al (2017) ont observé après plusieurs heures, une propagation de la fluorescence verte à un grand nombre de



mitochondries sur cardiomyocytes isolés et sur cœur entier, témoignant l'existence d'événements de fusion mitochondriale ( $\approx 1,4 \pm 0,1$  événement/min/cellule). Cette dernière est dépendante des oscillations calciques et de l'activité contractile cardiomyocytaire, expliquant la réduction importante des événements de fusion dans les cardiomyocytes en culture en comparaison aux cardiomyocytes fraîchement isolés. La dynamique mitochondriale cardiaque a également été confirmée par la visualisation en temps réel des événements de fusion et fission à l'échelle d'une mitochondrie via l'analyse des flash mitochondriaux (Qin et al., 2018). Un flash mitochondrial est une augmentation transitoire de la fluorescence mitochondriale, détectée par une protéine fluorescente, qui reflète l'activité de la chaîne de transport d'électrons et l'activation du métabolisme mitochondrial (Gong et al., 2015). Sachant que les événements de fusion et fission mitochondriale affectent le métabolisme mitochondrial, le mitoflash est utilisé ici comme un indicateur biologique permettant de mettre en évidence la dynamique mitochondriale. Dans cette étude, bien que des événements de fusion ou fission mitochondriale aient été observés ( $\approx 1,0$  événement de fission contre 3,9 événements de fusion pour un million de mitochondries en 100 s), ces derniers ont uniquement eu lieu entre mitochondries adjacentes et au niveau d'un site très restreint confirmant la faible mobilité des mitochondries cardiaques (Qin et al., 2018). De plus, ces événements se produisent bien moins fréquemment que dans d'autres types cellulaires (Qin et al., 2018).

Par ailleurs, les mitochondries de cardiomyocytes adultes ont été décrites comme des organites petits, arrondis et isolés entre les myofibrilles mais en aucun cas sous forme de réseaux interconnectés comme on peut le voir chez les cellules non-myocytaires tels que les fibroblastes (Dorn & Kitsis, 2015; Song & Dorn, 2015). En effet, alors que les mitochondries cardiaques apparaissent sous forme de longs filaments à l'état fœtal, on observe au cours des trois premières semaines après la naissance un changement progressif de la morphologie mitochondriale vers un phénotype principalement fissionné (Griffiths et al., 2010; Li et al., 2020). Face à cette observation, certaines études ont émis l'hypothèse que les mitochondries intrinsèquement fragmentées pourraient conférer un avantage biomécanique aux muscles striés, en comparaison avec des mitochondries interconnectées qui constitueraient un élément de résistance interne préjudiciable à la contraction des myocytes (Dorn & Kitsis, 2015). Cependant, la morphologie des mitochondries ainsi que le faible taux d'événements de fusion chez le cardiomyocyte adulte sont assez surprenants si l'on considère que la fusion mitochondriale est nécessaire pour maintenir une uniformité génétique et biochimique, essentielle pour assurer la fonction mitochondriale et la contractilité cardiaque. De manière intéressante, plusieurs études ont récemment découvert que les mitochondries cardiaques peuvent échanger leur contenu intra-mitochondrial via d'autres mécanismes, ne nécessitant pas de motilité, tels que le « kissing » ou les nanotunnels (Eisner et al., 2017; Huang et al., 2013; Qin et al., 2018). Le

phénomène de « kissing » ou « kiss and run » décrit l'accolement de deux mitochondries adjacentes suivi rapidement de leur séparation. Ce contact rapide et transitoire permet l'échange des composants de la matrice mitochondriale sans modification de la morphologie des mitochondries. Les nanotunnels quant à eux représentent une structure tubulaire permettant de relier deux mitochondries voisines ou éloignées. Ainsi, ces nouveaux mécanismes de communication inter-mitochondriale permettraient de pallier à l'arrangement spatial des mitochondries cardiaques et semblent être bien plus fréquents que la fusion ou la fission mitochondriale (Huang et al., 2013; Qin et al., 2018).

Ainsi, la dynamique mitochondriale, bien que faible dans les cardiomyocytes, est présente et indispensable pour la physiologie cardiaque. Les troubles de la dynamique mitochondriale sont d'ailleurs impliqués dans de nombreuses pathologies dont les maladies cardiovasculaires. Le rôle de la fusion et la fission dans l'exacerbation des lésions d'IR sera développé dans la partie Chapitre 1/ II.2.e.

## ii. Mécanismes impliqués dans la fission mitochondriale

Chez les mammifères, la fission mitochondriale est principalement orchestrée par la protéine cytosolique Drp1 (80kDa), appartenant à la famille des dynamines et caractérisée par son activité GTPasique (hydrolyse du GTP en GDP). La protéine Drp1 est composée de 4 domaines : le domaine N-terminal GTPase suivi d'un domaine central, d'un domaine variable puis d'un domaine effecteur GTPase en C-terminal (GED) (Figure 10b). L'activité GTPase est activée par la combinaison des domaines GED et GTPase (Muhlberg, 1997; Zhu et al., 2004) tandis que les domaines variable et GED sont responsables de l'activité de Drp1, déterminée par diverses modifications post-traductionnelles. Parmi elles, on distingue la phosphorylation, la SUMOylation, la O-GlcNAcylation, la S-nitrosylation et l'acétylation (Figure 10). De nombreuses études se sont intéressées au cours de la dernière décennie à la phosphorylation de Drp1, pouvant se produire au niveau de différentes sérines et impactant directement la translocation de Drp1 vers la mitochondrie. En effet, bien que la protéine Drp1 se localise majoritairement dans le cytosol en condition physiologique ( $\approx 97\%$ ) (Smirnova et al., 2001), une petite portion de Drp1 peut se transloquer vers la mitochondrie afin d'initier le processus de fission. Il a été rapporté que l'activation et la translocation de Drp1 vers la mitochondrie est régulée principalement par deux sérines clés, la sérine 616 (Ser616) et la sérine 637 (Ser637), dont la phosphorylation exerce des effets opposés (Figure 10). En effet, il a été rapporté que la phosphorylation de Drp1 sur la Ser616 est associée à la translocation de Drp1 vers la mitochondrie et à l'activation du processus de fission (Han et al., 2020; Xu et al., 2016). Au contraire, Drp1 est maintenue dans le cytosol lorsqu'elle est phosphorylée sur la Ser637, notamment par la PKA qui diminue son activité GTPase (Chang & Blackstone, 2007; Giacomello et al., 2020). La déphosphorylation de ce site, notamment par la calcineurine, une phosphatase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , induit la translocation de Drp1 vers la mitochondrie (Cereghetti et al., 2008) et sa liaison avec ses récepteurs localisés au



niveau de la membrane externe mitochondriale. Parmi eux, on distingue, le facteur de fission mitochondriale (MFF), les protéines de la dynamique mitochondriale (MID49, MID51) et la protéine de fission mitochondriale 1 (FIS1) (Figure 10). Le rôle spécifique de ces récepteurs ainsi que leur régulation restent encore à investiguer. Certaines études rapportent que Fis1 interviendrait plutôt au cours de la fission périphérique impliquée dans le processus de mitophagie tandis que MFF, récepteur le mieux caractérisé, interviendrait dans la fission médiane qui contribue à la biogenèse mitochondriale (Kleele et al., 2021; Shen et al., 2014). Par ailleurs, il semblerait que seule la délétion simultanée de plusieurs récepteurs perturbe considérablement le recrutement de Drp1 à la mitochondrie et induit un réseau mitochondrial fusionné suggérant qu'il existe une redondance entre les différents récepteurs de Drp1 (Osellame et al., 2016). Suite à la fixation de Drp1 sur ses récepteurs, la liaison du GTP induit la formation de polymères linéaires de Drp1 au niveau de la membrane mitochondriale externe. Ces derniers forment un anneau autour de la mitochondrie, stabilisé par l'interaction avec ses récepteurs. L'hydrolyse du GTP va induire le raccourcissement des polymères de Drp1 de manière à constringer la mitochondrie et induire sa scission complète (Kalia et al., 2018) (Figure 10).

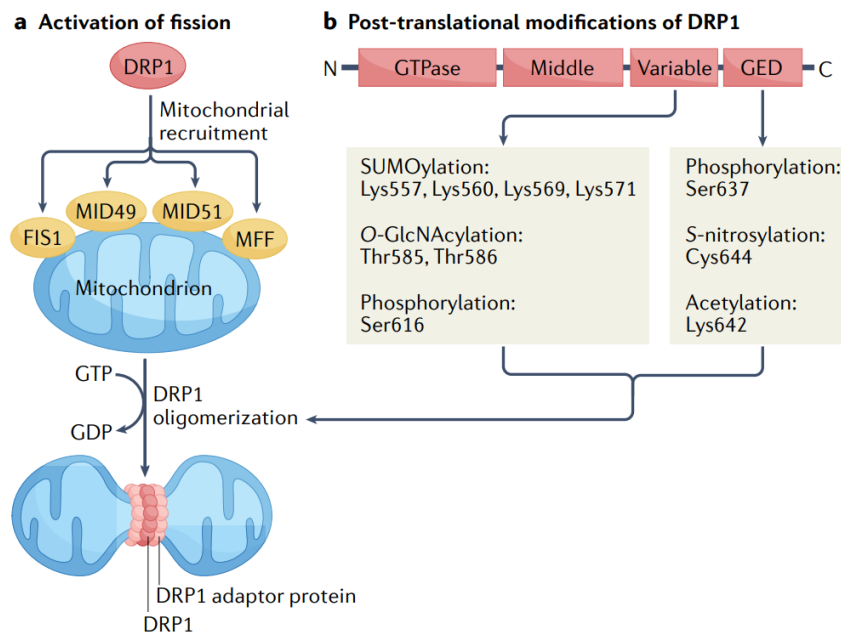


Figure 10 : Structure et mécanismes d'action de Drp1 dans la fission mitochondriale (Quiles et al, 2022).

De manière intéressante, il a été rapporté chez la levure que le recrutement de Drp1 à la membrane externe mitochondriale a lieu au niveau de zones de contact entre le réticulum et la mitochondrie. En effet, le réticulum jouerait un rôle majeur dans la fission mitochondriale en formant des tubules qui enveloppent la mitochondrie de manière à initier la constriction de la membrane externe mitochondriale (Friedman et al., 2011) (Figures 11 et 12). L'importance de cette pré-

constriction par le RE a été révélée par des études de biologie structurale rapportant que le diamètre de l'anneau contractile de Drp1 ( $\approx 100\text{nm}$ ) est beaucoup plus petit que le diamètre de la mitochondrie ( $\approx 0.5\text{-}1\mu\text{m}$ ) suggérant que Drp1 est incapable d'initier la constriction (Mears et al., 2011; Quintana-Cabrera & Scorrano, 2023). Ainsi, les tubules du RE en s'enroulant autour de la mitochondrie permettraient, avant le recrutement de Drp1, d'initier la constriction de la membrane externe permettant ensuite à Drp1 de s'oligomériser autour de la mitochondrie (Friedman et al., 2011; Korobova et al., 2013). Ce processus est soutenu par les protéines du cytosquelette tels que l'actine et la myosine qui vont se polymériser, en réponse à des élévations de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , pour former des filaments à l'interface entre mitochondrie et réticulum (Figure 12). L'accumulation des filaments d'actine contribuerait au processus de constriction par le RE mais soutiendrait également le recrutement et la polymérisation ultérieure de Drp1 (Fernandez-Sanz et al., 2021; Korobova et al., 2013; Moore et al., 2016). Par ailleurs, la myosine permettrait de fournir la force mécanique nécessaire pour entrainer la constriction de la membrane externe mitochondriale par les filaments d'actine (Korobova et al., 2014; Quintana-Cabrera & Scorrano, 2023).

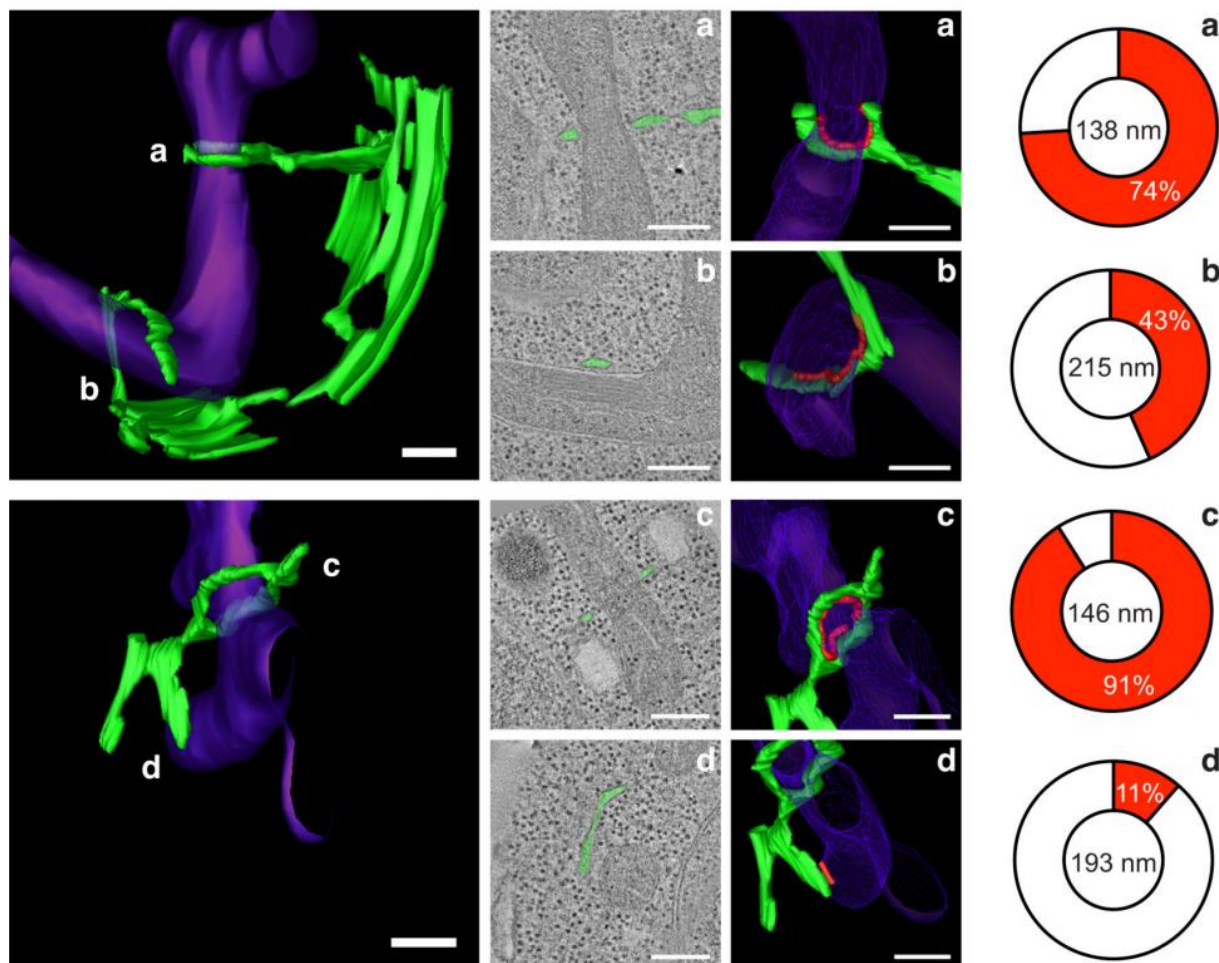


Figure 11 : Rôle du réticulum dans la constriction et la fission mitochondriale chez la levure (Friedman et al, 2011) Modèle 3D représentant les points de contact entre le réticulum endoplasmique (vert) et la mitochondrie (violet)

Pour finir, de manière intéressante, les sites de contact entre le réticulum et la mitochondrie forment également une plateforme fonctionnelle favorisant la transmission des signaux calciques. En effet, l'augmentation transitoire de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie via le MCU a été rapportée comme essentielle pour activer la constriction de la membrane interne mitochondriale avant la fission, de manière indépendante de Drp1 et de la constriction de la membrane externe (Cho et al., 2017). En ce sens, la déplétion en MCU induit une diminution de la fission mitochondriale en condition basale ou après un stress (Chakrabarti et al., 2018) et l'ablation de Drp1 résulte en une surexpression de MCU au niveau cardiaque (Qin et al., 2020). Pour finir, en favorisant les points de contact mitochondrie-réticulum, la polymérisation de l'actine permettrait de stimuler l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et d'initier la fission de la membrane interne avant celle de la membrane externe (Chakrabarti et al., 2018). Ainsi, la polymérisation de l'actine stimule indépendamment la dynamique des deux membranes pendant la division mitochondriale : la membrane interne par l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  matriciel, et la membrane externe par le recrutement de Drp1.

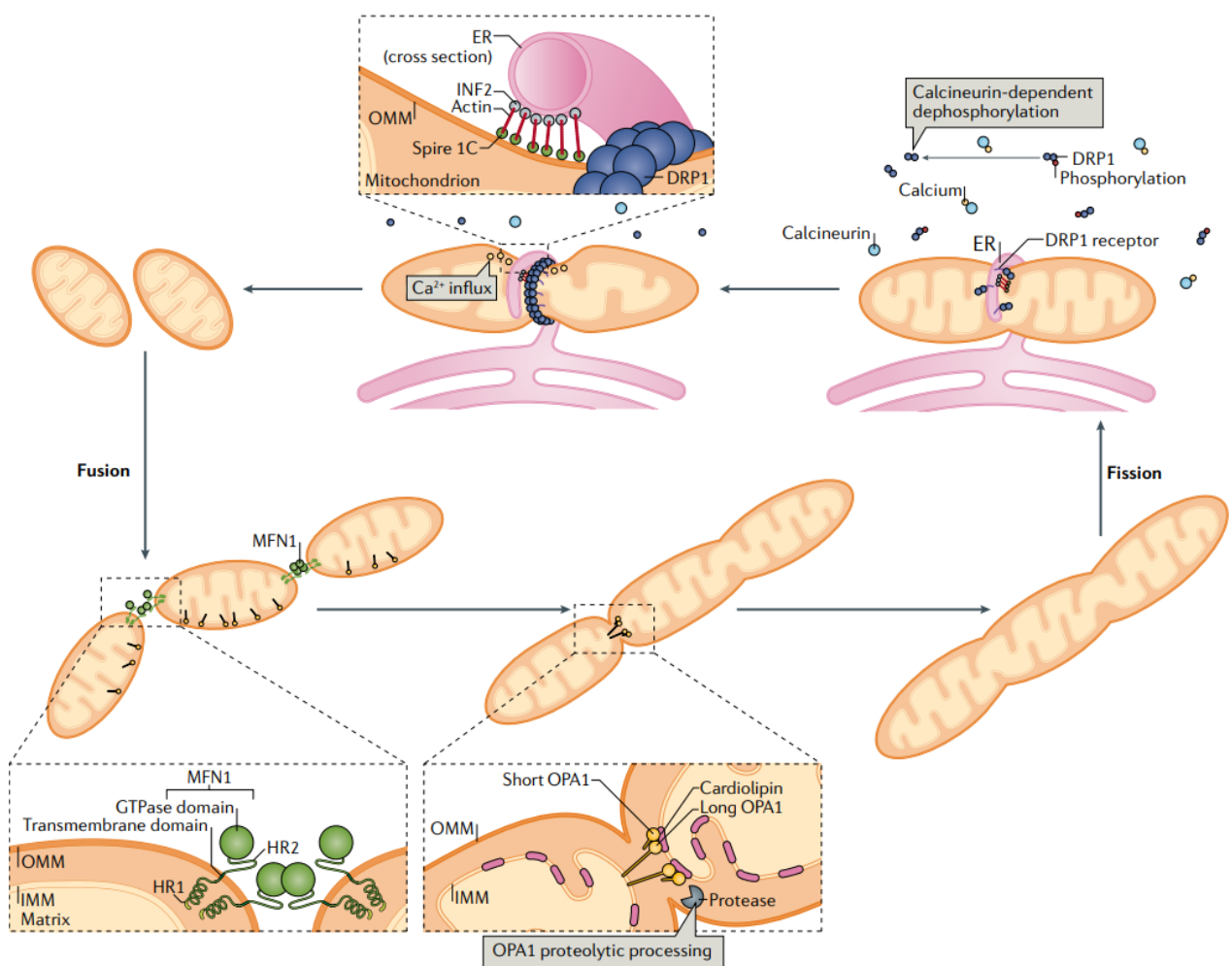


Figure 12 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la fusion et fission mitochondriale (Giacomello et al, 2020)

### iii. Régulation de la fission mitochondriale

La protéine Drp1 est soumise à diverses modifications post-traductionnelles qui régulent son activité et son recrutement en réponse à des changements redox ou à des modifications dans le statut métabolique cellulaire. Comme énoncé précédemment, Drp1 peut être phosphorylée au niveau de la Ser616, décrite comme le site activateur de la fission mitochondriale, ou au niveau de la Ser637, site inhibiteur de la fission. Cependant, alors qu'il est admis que la phosphorylation de Drp1 sur la Ser616 augmente la translocation de Drp1 vers la mitochondrie et le processus de fission mitochondriale (Han et al., 2020; Xu et al., 2016), les effets de la phosphorylation de Drp1 sur la Ser637 sont plus controversés. En effet, de nombreuses études rapportent que Drp1 est maintenue dans le cytosol lorsqu'elle est phosphorylée sur la Ser637 alors que sa déphosphorylation contribue à sa translocation vers la mitochondrie (Cereghetti et al., 2008; Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Strack, 2007). Néanmoins, des études ont récemment rapporté que Drp1 phosphorylée sur la Ser637 se transloquait à la mitochondrie (Yu et al., 2019) et favorisait la fission mitochondriale (Han et al., 2008; Jhun et al., 2018). Ainsi, on peut supposer qu'en fonction de la kinase impliquée, du modèle cellulaire ou des conditions utilisées, la phosphorylation de Drp1 sur la Ser637 n'induit pas les mêmes effets sur la dynamique mitochondriale. Quoi qu'il en soit, il semblerait que le statut redox de la cellule ainsi que la  $[Ca^{2+}]_c$  soient des déclencheurs majeurs de l'activation de Drp1. En effet, parmi les kinases régulant l'activité de Drp1, l'activation de la CaMKII par les ERO (Hu et al., 2019) ou par le  $Ca^{2+}$  (Kim et al., 2016) induit une phosphorylation de Drp1 sur la Ser616 et une augmentation de la fission mitochondriale. Par ailleurs, des études ont rapporté que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  active la kinase ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) qui phosphoryle Drp1 sur la Ser616 (Yu et al., 2011) tandis que la calcineurine, phosphatase dépendante du  $Ca^{2+}$  déphosphoryle Drp1 sur la Ser637 (Cereghetti et al., 2008; Zaja et al., 2014) conduisant *in fine* à l'augmentation de la fission mitochondriale. En adéquation avec ces résultats, l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  suite à la stimulation des cardiomyocytes à la thapsigargine (inhibiteur de SERCA) ou au KCl (activateur des DHRP) augmente la translocation de Drp1 et la fission mitochondriale. De manière intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur du MCU, le RU360 permet de prévenir la fragmentation des mitochondries en réponse à l'élévation calcique (Hom et al., 2010). Ainsi, considérant que les ERO et le  $Ca^{2+}$  semblent contribuer à l'activation de Drp1, il n'est pas étonnant d'observer des altérations de la dynamique mitochondriale au cours de l'IR (voir Chapitre 1/ II.2.e)

#### iv. Mécanismes impliqués dans la fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale est orchestrée par 3 protéines mitochondriales appartenant également à la famille des dynamines et caractérisées de ce fait par leur activité GTPasique. La fusion mitochondriale implique la fusion de la membrane externe mitochondriale assurée par les protéines Mfn1 et Mfn2 ainsi que la fusion de la membrane interne qui est médiée par la protéine OPA1. Mfn1 et Mfn2 sont des protéines très similaires caractérisées par une structure divisée en 4 domaines : un domaine de liaison au GTP en N-terminal, un domaine contenant 7 répétitions d'hélices alpha (HR1/coil-coil domain), un domaine transmembranaire bipartite et un second domaine d'hélices alpha (HR2) en C-terminal. Les domaines HR2 et GTPase sont tous deux exposés vers le cytosol (Figure 11) et jouent un rôle majeur dans la fusion de la membrane externe mitochondriale (Griffin & Chan, 2006; Koshiba et al., 2004). En effet, deux mitochondries adjacentes vont s'associer l'une à l'autre grâce au domaine HR2 qui assure l'oligomérisation homotypique (Mfn1-Mfn1) ou hétérotypique (Mfn1-Mfn2) *en trans* de deux Mfn (Koshiba et al., 2004; Schrepfer & Scorrano, 2016). Bien que Mfn1 soit reconnue comme jouant un rôle majeur dans l'association des membranes mitochondriales, le rôle de Mfn2 dans la fusion mitochondriale semble moins important (Cipolat et al., 2004; Ishihara et al., 2004). Cela pourrait s'expliquer par le fait que (i) Mfn2 joue également un rôle majeur dans l'interaction mitochondrie-réticulum (de Brito & Scorrano, 2008) (ii) Mfn1 présente une activité GTPasique huit fois plus élevée que Mfn2 (Ishihara et al., 2004). Pour finir, l'hydrolyse du GTP induit ensuite un changement de conformation des Mfns entraînant une augmentation de la surface de contact entre les deux membranes externes mitochondriales aboutissant *in fine* à la fusion membranaire (Ishihara et al., 2004; Quintana-Cabrera & Scorrano, 2023). La fusion des membranes internes est ensuite assurée par la protéine OPA1, ancrée dans la membrane interne mitochondriale par son domaine transmembranaire tandis que son domaine GTPase fait face à l'espace intermembranaire. OPA1 est nécessaire que sur une seule des deux mitochondries opposées puisqu'elle peut se lier *en trans* avec un composant lipidique de la membrane interne de la mitochondrie opposée, la cardiolipine (Ban et al., 2017) (Figure 11). La liaison OPA1-cardiolipine permet alors, suite à l'hydrolyse du GTP d'induire la fusion des membranes internes mitochondriales. Plus précisément, la fusion dépend du ratio entre les différentes formes d'OPA1. En effet, OPA1 existe sous forme longue (L-OPA1) ancrée à la membrane interne mitochondriale mais également sous forme courte soluble (S-OPA1) suite à un clivage protéolytique (Figure 11). Il a été rapporté que seule L-OPA1 peut se lier à la cardiolipine et induire la fusion des membranes internes mitochondriale ; cependant l'association de S-OPA1 avec le complexe L-OPA1/cardiolipine permet de potentialiser l'interaction et induire une fusion mitochondriale efficace et rapide (Ban et al., 2018; Ge et al., 2020).

## v. Régulation de la fusion mitochondriale

Les protéines impliquées dans la fusion mitochondriale sont elles aussi soumises à diverses modifications post-traductionnelles régulant leur activité telles que la phosphorylation, l'oxydation et l'ubiquitylation. Tout comme Drp1, les Mfns semblent sensibles au statut redox cellulaire et à la  $[Ca^{2+}]_c$ . En effet, il a récemment été montré que l'oxydation des cystéines présentes au niveau de leur domaine C-terminal (projeté dans l'espace intermembranaire) entraîne l'oligomérisation des Mfns et la fusion mitochondriale ultérieure (Mattie et al., 2018). Par ailleurs, la phosphorylation des Mfns semble avoir été beaucoup moins investiguée que celle de Drp1. Il a été rapporté que la phosphorylation de Mfn1 par ERK (Pyakurel et al., 2015) ou la phosphorylation de Mfn2 par JNK (c-Jun N-terminal kinase) inhiberait la fusion mitochondriale et stimulerait l'apoptose (Leboucher et al., 2012). Par ailleurs, une étude sur cardiomyocytes a rapporté que les oscillations calciques étaient essentielles pour assurer l'expression de Mfn1 et la fusion mitochondriale mais les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus (Eisner et al., 2017). Pour finir, l'un des aspects majeurs de la régulation d'OPA1 est son clivage par les protéases Oma1 (overlapping activity with m-AAA protease 1) et Yme111 (ATP-dependent zinc metalloprotease) conduisant à la forme courte et soluble d'OPA1 (Quintana-Cabrera & Scorrano, 2023). A l'état basal une proportion équivalente de forme courte et longue d'OPA1 est requise pour assurer la fusion mitochondriale (Song et al., 2007). Cependant, en condition de stress (dépoliarisation membranaire, déplétion en ATP ou stimuli apoptotique), la suractivation de Oma1 est à l'origine d'une augmentation du clivage protéolytique de OPA1 induisant une prépondérance de la forme S-OPA1 qui entrainerait majoritairement une fragmentation mitochondriale (Anand et al., 2014; Duvezin-Caubet et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Ainsi, il a été rapporté que la délétion conditionnelle cardiomyocytaire de Yme11 induit une fragmentation accrue des mitochondries suite au clivage d'OPA1 induisant progressivement une cardiomyopathie dilatée, caractérisée par de la nécrose cellulaire, de la fibrose et un remodelage ventriculaire (Wai et al., 2015)). De manière intéressante, la délétion additionnelle de Oma1 permet de prévenir la fission mitochondriale et le développement de la cardiomyopathie (Wai et al., 2015). Ainsi, la régulation du clivage d'OPA1 semble jouer un rôle crucial dans l'intégrité et le contrôle de la qualité des mitochondries.

## Message à retenir

La mitochondrie a longtemps été étudiée pour son rôle de centrale énergétique. Néanmoins, il est admis aujourd'hui que son implication dans l'homéostasie cellulaire est bien plus complexe. Notamment, la dynamique du réseau mitochondrial joue un rôle central dans la capacité des mitochondries à moduler (i) la production d'ERO, essentielle à la signalisation redox cellulaire mais pouvant devenir un élément clé des lésions cellulaires, (ii) les interactions avec d'autres organites, dont le réticulum, permettant notamment d'impacter l'homéostasie calcique cellulaire et d'adapter la bioénergétique aux besoins cellulaires. Ainsi, les dérèglements de cette dynamique mitochondriale semblent pouvoir jouer un rôle clé dans les dysfonctions et la mort de la cellule.



## 2. Altérations mitochondriales lors de l'ischémie-reperfusion

La fonction contractile cardiaque étant dépendante de la phosphorylation oxydative, toute dysfonction de l'homéostasie mitochondriale conduit à des défauts de fonctionnement de l'organe. Ainsi, au cours de l'IR, la surcharge calcique mitochondriale associée à la production massive d'EROMt aboutissent à l'activation du mPTP, reconnu comme un acteur clé dans les lésions myocardiques de reperfusion (Kuznetsov et al., 2019; Yellon & Hausenloy, 2007).

### a. Surproduction d'EROMt au cours de l'IR

Bien que l'idée d'une production accrue d'ERO au cours de l'ischémie puisse paraître contre intuitive, cette dernière a toutefois été mise en évidence dans de nombreuses études (Becker, 2004; Kevin et al., 2003; Pasdois et al., 2008). En effet, même en cas d'ischémie importante, le cœur n'est jamais en anoxie totale. De plus, la cytochrome c oxydase (complexe IV) ne consommant pas rapidement tout l'O<sub>2</sub> résiduel, celui-ci peut, en début d'ischémie, conduire à une augmentation de la production d'ERO (Bugger & Pfeil, 2020; Zhu & Zuo, 2013). Il est aujourd'hui largement admis que la production d'ERO au cours de l'ischémie est principalement médiée par la mitochondrie, cependant les mécanismes sous-jacents sont encore débattus. La diminution de la disponibilité en O<sub>2</sub> semble ralentir fortement le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire mitochondriale induisant ainsi une accumulation à l'état réduit des transporteurs d'électrons (NADH, FADH<sub>2</sub> et CoQ). Ce phénomène favorise finalement la fuite d'électrons et la formation d'O<sub>2</sub><sup>•</sup>, notamment par les complexes I et III de la CTE (Becker et al., 1999; Rouslin, 1983; Solaini & Harris, 2005). En effet, il est admis que l'ischémie est à l'origine d'altérations fonctionnelles des complexes de la CTE favorisant la fuite d'électrons et la production d'ERO (Abe et al., 1999; Galkin et al., 2009; Lesnefsky et al., 2017). Par ailleurs, l'ischémie induit également une diminution de l'activité des complexes I, III et IV ayant pour conséquence une chute drastique de la phosphorylation oxydative et une libération du cytochrome c dans le cytosol (Lesnefsky et al., 1997; Solaini & Harris, 2005). L'oxydation de la cardiolipine, phospholipide caractéristique de la membrane interne mitochondriale, semble également pouvoir participer aux troubles de la CTE (Lesnefsky et al., 2001; Paradies et al., 1999). Ainsi, bien que le stress oxydant soit plutôt modéré pendant la phase ischémique, il semble pouvoir impacter l'intégrité fonctionnelle des mitochondries, et ainsi conditionner la réponse de ces organites au cours de la reperfusion (Bugger & Pfeil, 2020; Murphy & Steenbergen, 2008).

Lors des toutes premières minutes de la reperfusion, la reprise brutale de la phosphorylation oxydative va aboutir à une production massive d'EROMt. En effet, la prise en charge des intermédiaires



réduits par les différents complexes mitochondriaux, fonctionnellement endommagés au cours de l'ischémie, augmente la probabilité d'une fuite anormale d'électrons et ainsi la production massive d' $O_2^{\bullet-}$ . Dans ces conditions, le complexe I a été proposé comme la principale source de production d' $O_2^{\bullet-}$  lors de la reperfusion, bien que des quantités moindres mais néanmoins significatives d'ERO puissent être générées au niveau du complexe III (Bugger & Pfeil, 2020; Chouchani et al., 2016; Solaini & Harris, 2005). En effet, la reperfusion induit un changement de conformation du complexe I, de sa forme inactive vers sa forme active, induisant sa réactivation rapide et la production d'une grande quantité d' $O_2^{\bullet-}$  (Chouchani et al., 2014; Gorenkova et al., 2013). Ainsi, l'inhibition pharmacologique du complexe I ou son blocage temporaire dans sa forme inactive limite la production d'EROmt et protège des lésions d'IR (Chen et al., 2006; Chouchani et al., 2016; Lesnefsky et al., 2004) suggérant que la prévention de la réactivation du complexe I lors de la reperfusion constituerait une stratégie thérapeutique. Alors que les mécanismes sous-jacents expliquant la génération massive d'EROmt au cours de la reperfusion ont longtemps été incompris, le phénomène de « flux réverse d'électrons » ou « retour électronique » a récemment été mis en évidence (Chouchani et al., 2014; Murphy, 2009; Pell et al., 2016). En effet, il a été démontré que la succinate déshydrogénase (SDH) au cours de l'ischémie peut fonctionner en mode réverse et ainsi entraîner l'accumulation de succinate. À la reperfusion, la reprise de l'activité « normale » de la SDH induit l'oxydation rapide du succinate accumulé en fumarate induisant une sur-réduction du pool de CoQ. On observe alors qu'une partie des électrons transportés par l'ubiquinone ne sont pas dirigés vers le complexe III (sens normal) mais reviennent vers le complexe I où ils réagissent avec l' $O_2$  pour former une quantité importante d' $O_2^{\bullet-}$ . De manière intéressante, le mécanisme de « flux réverse d'électrons » produit une quantité d' $O_2^{\bullet-}$  nettement supérieure à tout autre processus mitochondrial (Murphy, 2009) et est donc proposé comme une cible d'intérêt dans la cardioprotection (Prag et al., 2023). Il est dès lors intéressant de noter que la diminution de l'accumulation de succinate au cours de l'ischémie ou l'inhibition de son oxydation lors de la reperfusion permet de réduire les lésions d'IR in vivo dans des modèles murins d'infarctus du myocarde (Chouchani et al., 2014). Ainsi, il est aujourd'hui bien décrit que la surproduction d' $O_2^{\bullet-}$  participe de manière majeure aux dommages cellulaires observés au cours de la reperfusion. De manière encore plus critique, l' $O_2^{\bullet-}$  peut réagir avec le NO pour former des ERO azotées telles que le ONOO<sup>-</sup>, reconnu pour sa forte cytotoxicité. L' $O_2^{\bullet-}$  peut aussi être réduit en  $H_2O_2$  par la SOD. Bien que l' $H_2O_2$  ne soit pas en soi une espèce radicalaire, cette ERO possède tout de même une forte toxicité de par son interaction possible avec les ions métalliques (via la réaction de Fenton) aboutissant à la formation d'une espèce radicalaire très cytotoxique, le radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ). Ce dernier est responsable de la plupart des dommages observés lors de la reperfusion puisqu'il possède une forte réactivité avec tous les matériaux biologiques. Ainsi, le « burst oxydatif » observé à la reperfusion et dépassant largement les capacités des systèmes antioxydants cellulaires consommés en partie durant l'ischémie (Ferrari et

al., 1993), va être à l'origine de nombreux dommages cellulaires et mitochondriaux. (Murphy & Steenbergen, 2008). Notamment, ces ERO de reperfusion vont être capable d'impacter i) les cardiolipines, aggravant les altérations de la chaîne respiratoire (Paradies et al., 2004; Petrosillo et al., 2003; Solaini & Harris, 2005), ii) les lipides membranaires, fragilisant les membranes cellulaires et augmentant la perméabilité de la membrane interne mitochondriale, iii) l'ADN mitochondrial et finalement iv) la sensibilité des mitochondries à la surcharge calcique matricielle favorisant *in fine* l'ouverture du mPTP, déclencheur clé de la mort cellulaire au cours de l'IR (voir Chapitre 1/II.2.d). Par ailleurs, il semblerait qu'au cours de la reperfusion un mécanisme de « ROS-induced ROS release » (RIRR) puisse participer à l'auto-amplification de la production ERO. Ce phénomène, encore très discuté est observable lors de l'excitation laser de mitochondries cardiaques et est à l'origine d'une perte rapide du  $\Delta\Psi_m$  due à l'ouverture transitoire du mPTP, suivie d'une production rapide d'ERO. Ce phénomène de RIRR dans les cardiomyocytes se produit souvent de manière synchrone et réversible entre les mitochondries adjacentes (Zorov et al., 2000, 2014). Son existence dans le cadre particulier de l'IR mérite néanmoins d'être confirmé.

Pour finir, la CTE n'est pas la seule source d'ERO au cours de l'IR. En effet, les monoamines oxydases (Kaludercic et al., 2011), les NADPH oxydases (Braunersreuther et al., 2013; Lassègue et al., 2012), les xanthines oxydases (Linass et al., 1990) ou encore les NO synthases découplées (Granger & Kvietys, 2015) peuvent participer à la production d'ERO lors de l'IR. Néanmoins, leurs contributions seraient considérées comme secondaires et subséquentes à la production d'EROMt.

Ainsi, au regard de la littérature, il semble à ce jour assez évident que les défauts de fonctionnement de la CTE au cours de l'IR, conduisant à une surproduction EROmt, participent de manière majeure aux lésions d'IR myocardique. Néanmoins, en dépit de cette évidence, la difficulté à moduler cette production d'EROMt au cours de la reperfusion et le manque d'efficacité des stratégies basées sur l'utilisation d'antioxydants, suggère fortement que l'amélioration de la compréhension des mécanismes cellulaires à l'origine de ce phénomène soit essentielle afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## b. Surcharge calcique mitochondriale au cours de l'IR

Les oscillations transitoires de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie jouent un rôle crucial dans la stimulation du métabolisme cardiaque. Néanmoins, la surcharge calcique mitochondriale prolongée est à l'origine de dysfonctionnement mitochondriaux aboutissant à la mort des cellules (Giorgi et al., 2018; Rasola & Bernardi, 2011). Lors de l'IR, la surproduction d'ERO associée à la surcharge calcique mitochondriale favorisent l'ouverture du mPTP, acteur clé dans la nécrose et l'apoptose des cellules cardiaques (voir Chapitre 1/II.2.d).

Comme détaillé dans le chapitre 1/I.2.a., l'arrêt du métabolisme oxydatif lors de l'ischémie est à l'origine d'une acidose cellulaire aboutissant à une surcharge intracellulaire sodique puis calcique. La surcharge calcique cytosolique s'accompagne d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , qui pour autant reste modérée (Murata et al., 2001; Ruizmeana et al., 2006). En effet, la diminution massive de l'activité de la CTE lors de l'ischémie induit une chute du  $\Delta\Psi_m$  limitant l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par le MCUc, uniporteur très dépendant de l'énergie du potentiel membranaire (Murphy & Steenbergen, 2008). Néanmoins, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie au cours de l'ischémie ne semble pas uniquement faire intervenir le MCUc (Ashok et al., 2023; Petersen et al., 2023). En effet, l'équipe d'Elizabeth Murphy a récemment rapporté que les cœurs provenant de souris délétés en MCU présentent une  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  plus faible, après 20 minutes d'ischémie, que les animaux contrôles. Cependant, l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  est tout de même visible dans les cœurs délétés pour MCU suggérant que la surcharge calcique mitochondriale pendant l'ischémie ne dépend pas uniquement du MCUc. Plusieurs études in vitro ont mis en évidence que l'inhibition du NCLX permet de prévenir l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  au cours de l'ischémie suggérant que le NCLX fonctionnerait en mode « réverse » et favoriserait l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie (Ashok et al., 2023; Griffiths, 1999).

Lors de la reperfusion, la correction de l'acidose cellulaire va exacerber la surcharge cytosolique sodique puis calcique. Parallèlement, la reprise de la chaîne respiratoire mitochondriale permet le rétablissement du  $\Delta\Psi_m$  potentialisant ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Il est aujourd'hui admis que l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ , en contribuant à l'ouverture du mPTP, joue un rôle majeur dans la mort cellulaire suite à l'IR. En effet, la diminution de la surcharge calcique mitochondriale, en diminuant l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par le MCU ou en augmentant l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  par le NCLX, est apparue ces dernières années comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour limiter les lésions d'IR (Lambert et al., 2019; Luongo et al., 2015, 2017). Ainsi, une attention toute particulière a été portée sur le rôle clé du MCU. Alors que la délétion non-conditionnelle du MCU (Pan et al., 2013; Rasmussen et al., 2015) n'a aucun effet sur la sensibilité du cœur à l'IR, il est intéressant de noter que

la délétion induite et cardiomyocytaire du MCU chez la souris à l'âge adulte protège contre la surcharge calcique mitochondriale, retarde l'activation du mPTP et limite la taille d'infarctus (Kwong et al., 2015; Luongo et al., 2015). Les divergences dans les résultats pourraient être attribuées à des adaptations phénotypiques liées à la délétion totale non induite de MCU avant ou après la naissance. Il est alors intéressant de noter que l'utilisation d'un inhibiteur du MCU, le RU360 sur cœur isolé perfusé (Miyamae et al., 1996) ou in vivo sur souris (Guan et al., 2019), diminue fortement la  $[Ca^{2+}]_m$  et la sensibilité du cœur à l'IR. Ces résultats pharmacologiques viennent confirmer les données suggérant un rôle majeur de la surcharge calcique médiée par le MCU dans la sévérité de l'infarctus du myocarde. Par ailleurs, la CAMKII mitochondriale, activée lors de l'IR, semble pouvoir directement interagir et phosphoryler le MCU, entraînant une entrée accrue de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie (Joiner et al., 2012). De manière intéressante, les souris transgéniques exprimant le peptide CAMKIIN, puissant inhibiteur de la CAMKII, spécifiquement au niveau des mitochondries cardiaques, présentent une entrée réduite de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie, une ouverture retardée du mPTP et sont protégées contre les lésions d'IR (Joiner et al., 2012). Ces résultats ont néanmoins été remis en question deux années après leur publication par les travaux de Fieni et al. (Fieni et al., 2014). Cela souligne l'intérêt de conduire des études complémentaires afin de mieux comprendre l'impact de la CAMKII mitochondriale sur la régulation du MCU au cours de l'IR. Pour finir, il a été rapporté que le cœur est capable d'augmenter l'expression du MCUB (dominant négatif du MCU) 48h après une IR in vivo, suggérant un mécanisme adaptatif permettant de limiter l'accumulation de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie (Lambert et al., 2019). En accord avec ce concept, il a été rapporté que la surexpression cardiaque du MCUB chez un modèle murin protège le cœur contre les lésions d'IR (Lambert et al., 2019). Le même résultat a été obtenu avec la surexpression du NCLX permettant d'améliorer la régulation de la  $[Ca^{2+}]_m$  (Luongo et al., 2017).

Par ailleurs, lors de l'IR, l'activité du RyR2, protéine impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique au cours du CEC, a été rapporté comme étant fortement altérée. Ceci semble participer à l'exacerbation de la surcharge calcique cytosolique mais également mitochondriale lors de l'IR (Fauconnier et al., 2013; Feno et al., 2019). La diminution de la production d'ATP au cours de l'IR est aussi à l'origine d'une diminution de l'activité de SERCA renforçant ainsi la surcharge calcique cytosolique et certainement mitochondriale. De plus, la surproduction d'ERO cellulaires ainsi que la surcharge calcique cytosolique vont stimuler l'activité de kinases telles que la CAMKII et la PKA, capables de moduler l'activité du RyR2 (Di Carlo et al., 2014; Haushalter et al., 2019). Ainsi, l'oxydation de CaMKII a été décrite comme jouant un rôle majeur dans l'apoptose myocardique, l'altération de la fonction cardiaque et dans la mortalité post-IR (Erickson et al., 2008). Ces résultats semblent pouvoir être expliqués par le fait que l'augmentation de la phosphorylation de RyR2 (Ser2814 ou Ser2808) par la CAMKII contribue à son instabilité. En effet, chez des souris mutantes, caractérisées par une

mutation ponctuelle du RyR2 au niveau de son résidu Ser2814, rendant ce récepteur non phosphorylable, présentent une meilleure récupération fonctionnelle après une IR in vivo et une taille d'infarctus réduite (Di Carlo et al., 2014). Ces résultats suggèrent un rôle clé de l'hyperphosphorylation du RyR2 par la CAMKII dans la sévérité des lésions d'IR. Par ailleurs, alors qu'il existe aujourd'hui des preuves solides qu'une phosphorylation de RyR2 par la PKA contribue à la dysfonction contractile dans l'insuffisance cardiaque (Dobrev & Wehrens, 2014), son rôle dans les fuites calciques diastoliques au cours de l'IR reste à investiguer. Enfin, l'activité du RyR2 a également été décrite comme pouvant être impactée par des modifications redox post-traductionnelles. Ainsi, il a été décrit que l'oxydation (Bovo et al., 2018; Terentyev et al., 2008) et/ou la S-nytrosylation (Fauconnier et al., 2011) du RyR2 lors de situations de stress oxydant ou nitro-oxydant favorisent son instabilité et la survenue de fuites calciques diastoliques du RS au cours de l'IR. Ces dernières sont à l'origine d'oscillations calciques cytosoliques, reconnues comme jouant un rôle majeur dans l'initiation des arythmies de reperfusion et dans l'altération de la fonction contractile myocardique (Fauconnier et al., 2011; Lehnart et al., 2006)

De manière intéressante, Santulli et al. (2015) ont rapporté que les fuites calciques diastoliques du RS contribuent à la surcharge calcique mitochondriale et aux dysfonctions cellulaires post-IR (Santulli et al., 2015). Ainsi, l'existence de microdomaines cellulaires localement restreints, les MAMs, en favorisant les échanges de  $Ca^{2+}$  entre le réticulum et la mitochondrie, pourraient renforcer *in fine* les troubles de l'homéostasie calcique mitochondriale au cours de l'IR (Eisner et al., 2013; Ruiz-Meana et al., 2010). Au cours de la dernière décennie, plusieurs études se sont intéressées au rôle de la communication RS-mitochondrie dans la surcharge calcique mitochondriale et les lésions cellulaires au cours de l'IR (Gomez et al., 2016; Paillard et al., 2013; Qiao et al., 2017). Paillard et al. (2013) ont ainsi observé que l'hypoxie-réoxygénation induit une augmentation des points de contact mitochondrie-réticulum favorisant l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie. De manière intéressante, la diminution des interactions mitochondrie-réticulum via l'utilisation de ARNsi ciblant les protéines Mfn2 ou Grp75, impliquées dans la liaison des deux organites, permet de prévenir la surcharge calcique mitochondriale et la mort cardiomyocytaire suite à l'hypoxie-réoxygénation (Paillard et al., 2013). De plus, la délétion cardiaque de PTPIP51 (protein tyrosine phosphatase interacting protein-51), une protéine surexprimée lors de l'IR et impliquée dans la liaison mitochondrie-RS, réduit la surcharge calcique mitochondriale, la taille infarctée et les lésions cardiaques après une IR in vivo (Qiao et al., 2017). En lien avec ces résultats, les souris délétées en Mfn2 spécifiquement au niveau cardiomyocytaire présentent une réduction des points de contacts mitochondrie-RS (Beikoghli Kalkhoran et al., 2017; Chen et al., 2012), associée à une diminution de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie (Chen et al., 2012), une ouverture retardée du mPTP et une meilleure récupération fonctionnelle après IR (Papanicolaou et al.,

2011). De plus, la délétion induite spécifiquement cardiomyocytaire de Mfn1 et Mfn2 chez des souris à l'âge adulte est à l'origine d'une fission mitochondriale exacerbée associée à une respiration mitochondriale et une fonction contractile cardiaque altérées. Il est par contre intéressant de noter que ces souris sont protégées contre les lésions cellulaires liées à l'infarctus du myocarde (Hall et al., 2016). En effet, ces souris présentent une ouverture du mPTP retardée et une taille d'infarctus fortement réduite. Cette résistance à l'IR est expliquée par une diminution des interactions mitochondries-RS, due à l'absence de Mfn2, associée à une surcharge calcique mitochondriale et une production d'ERO diminuée (Hall et al., 2016). Ainsi, l'ensemble de ces études suggèrent un rôle majeur des interactions mitochondrie-réticulum dans la surcharge calcique mitochondriale et la sensibilité du cœur à l'IR.

### c. Cercle vicieux entre ERO et $Ca^{2+}$ au cours de l'IR

Il est maintenant bien reconnu qu'il existe une interaction complexe et bidirectionnelle entre la production d'EROMt et la surcharge calcique mitochondriale. En effet, les ERO, en modifiant l'activité des complexes protéiques tels que le RyR2 et le MCU influencent fortement l'homéostasie calcique cellulaire et mitochondriale ; alors que le  $Ca^{2+}$ , en agissant de manière directe et indirecte sur la CTE (Feno et al., 2019; Görlach et al., 2015) et sur l'ouverture du mPTP (Rottenberg & Hoek, 2017) joue un rôle majeur dans la production d'EROMt. Ainsi, au niveau des zones d'associations entre mitochondries et RS, on observe l'établissement d'un cercle vicieux entre  $Ca^{2+}$  et ERO, qui lors de l'IR contribue à l'ouverture du mPTP et à la mort cellulaire associée (voir Chapitre1/ II.2.d).

L'oxydation de RyR2 a largement été décrite comme contribuant à la modulation de son activité. Plus récemment, la production d'EROMt a été proposée comme un acteur clé de ce phénomène. En effet, plusieurs études ont rapporté que l'augmentation de la production d'EROMt participe à l'augmentation des fuites calciques diastoliques du RS (Bovo et al., 2012; Yan et al., 2008). Ainsi, Hamilton et al. (2020) ont rapporté qu'un cercle vicieux entre production d'EROMt et désordres de l'homéostasie calcique cellulaire contribue à l'apparition d'épisodes arythmiques. En effet, ils ont pu montrer que les EROmt en oxydant RyR2 augmentent les fuites calciques incontrôlées du RS, qui à leur tour accentuent la surcharge calcique mitochondriale et la production d'EROMt (Hamilton et al., 2020). En ce sens, le traitement des cardiomyocytes avec du MitoTempo, un antioxydant mitochondrial, permet de prévenir les fuites calciques du RS (Hamilton et al., 2020). Par ailleurs, l'activité du MCU semble elle aussi pouvoir être impactée par les EROmt. En effet, Dong et al, sur des modèles cellulaires non cardiomyocytaires (cellules endothéliales, Hela, HEK), ont récemment rapporté que le MCU pouvait être S-glutathionylé en réponse à une modification de l'état redox mitochondrial. Cette modification redox post-transcriptionnelle est à l'origine d'une augmentation de

la stabilité du complexe et de la formation d'oligomères favorisant l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries et *in fine* la surproduction d'EROmt et la mort cellulaire (Dong et al., 2017). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent fortement l'existence d'une interaction bidirectionnelle entre production d'EROmt et désordres de l'homéostasie calcique mitochondriale (Figure 13). En effet, dans cette relation complexe, les EROmt ont un impact non négligeable sur les troubles de l'homéostasie calcique et il est aujourd'hui de mieux en mieux décrit que le  $\text{Ca}^{2+}$  participe également à la surproduction d'EROmt au cours de l'IR (Görlach et al., 2015). En effet, bien que le  $\text{Ca}^{2+}$  soit un activateur physiologique de la phosphorylation oxydative (voir Chapitre I/II.1.c.ii.), lorsqu'il s'accumule de manière trop importante dans la matrice mitochondriale, il favorise la production d'EROmt (Peng & Jou, 2010). Notamment, une  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  élevée accélère l'activité de la CTE et la consommation d' $\text{O}_2$ , favorisant la fuite d'électrons et la formation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Brookes et al., 2004; Görlach et al., 2015). De plus, l'accumulation de précipités de phosphate de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale entrave l'activité du complexe I et perturbe l'intégrité des crêtes mitochondriale aboutissant à une diminution de la respiration mitochondriale et de la production d'ATP (Malyala et al., 2019). Ces mécanismes pourraient expliquer pourquoi, dans le cadre de l'IR, l'entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie par le MCU, contribue à la surproduction d'ERO et aux dysfonctions mitochondriales sous-jacentes (Bertero & Maack, 2018).

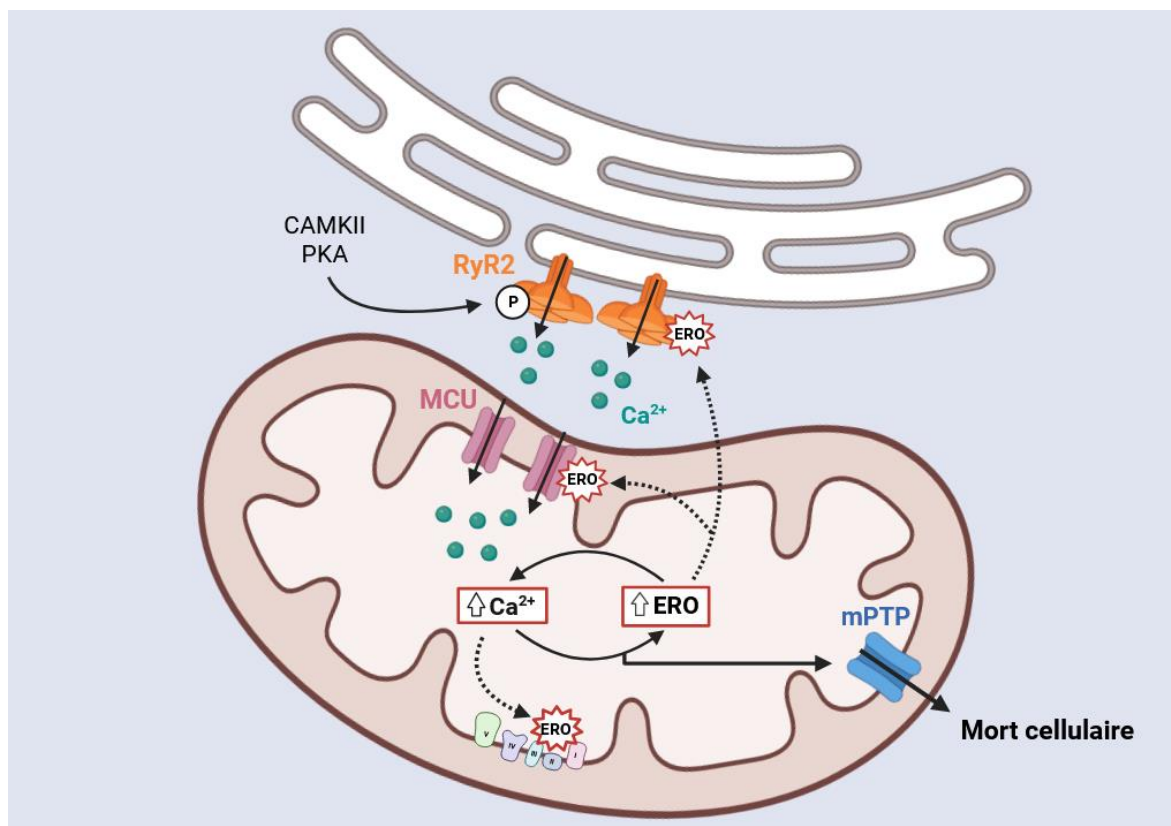


Figure 13 : Représentation schématique du rôle possible des interactions mitochondrie-réticulum dans l'établissement du cercle vicieux entre surcharge calcique et surproduction d'ERO au cours de l'IR



#### d. Ouverture du mPTP: « a pore way to die »

Lorsque le rôle clé du mPTP dans les lésions d'IR a été mis en évidence par Baines et al., (2005) et Nakagawa et al.(2005) dans la revue Nature, l'importance de cette découverte a conduit à la publication d'un éditorial de la part de Andrew Halestrap intitulé « a pore way to die » (A. Halestrap, 2005).

Il est désormais largement admis que les lésions irréversibles du cœur suite à l'IR sont médiées, au moins en partie, par l'ouverture du mPTP (Bernardi & Di Lisa, 2015; A. P. Halestrap, 2010; Kwong & Molkentin, 2015). Ce phénomène commence après environ 2 minutes de reperfusion et coïncide avec le retour du pH intracellulaire à des valeurs similaires à celles avant l'ischémie (Andrienko et al., 2017). La surcharge calcique dans la matrice mitochondriale est reconnue comme l'inducteur majeur de l'ouverture du mPTP au cours de la reperfusion ischémique. Néanmoins, la sensibilité du mPTP au  $Ca^{2+}$  est aussi considérablement augmentée par le stress oxydatif, l'augmentation des concentrations en  $P_i$  ainsi que la déplétion en nucléotides adényliques (ATP/ADP) (Kwong & Molkentin, 2015). Le mPTP est un complexe multiprotéique composé d'un canal non-spécifique situé dans la membrane interne mitochondriale et susceptible de laisser passer les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 1,5 kDa. L'ouverture du mPTP est régulée par la protéine cyclophiline D (CypD), qui en se liant au mPTP, augmente la sensibilité du canal pour le  $Ca^{2+}$  (Baines et al., 2005; Bernardi & Di Lisa, 2015). L'implication de la CypD dans la régulation du mPTP a été découverte grâce à l'étude du médicament immunosuppresseur Cyclosporine A (CsA) qui permet de limiter le gonflement matriciel des mitochondries (Halestrap & Davidson, 1990). Ainsi, il a été démontré que la CsA est capable de se lier à la CypD et d'empêcher sa liaison avec le mPTP inhibant ainsi l'ouverture du canal (Crompton et al., 1988, 1998; Fournier et al., 1987). Bien que la CsA s'est révélée être un agent cardioprotecteur efficace dans plusieurs études utilisant des modèles animaux d'IR (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005), son efficacité a été remise en cause par des essais cliniques à grande échelle (Cung et al., 2015) suggérant que le mPTP est capable de s'ouvrir indépendamment de la CypD si le stress mitochondrial est suffisamment important (Halestrap & Richardson, 2015; Ramachandra et al., 2020).

Au cours de l'IR, l'ouverture du mPTP dès les premières minutes de reperfusion est reconnue comme un élément clé participant à la mort cellulaire. Lors de l'ischémie, bien que l'on observe une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$  et de la production d'EROMt, l'acidose cellulaire permet de maintenir le mPTP en conformation fermée et de limiter la mort des cardiomyocytes. Cependant, la normalisation du pH à la reperfusion, associée à l'installation du cercle vicieux entre surcharge calcique et surproduction d'EROMt conduit à l'activation prolongée du mPTP. Cette dernière représente pour la



cellule un point de non-retour vers la mort, qu'elle soit de nature nécrotique ou apoptotique. En effet, l'ouverture du mPTP est à l'origine d'une perte de l'imperméabilité originelle de la membrane interne mitochondriale, induisant plusieurs phénomènes concomitants. Tout d'abord, la diffusion incontrôlée des protons à travers la membrane interne va induire un découplage de la phosphorylation oxydative et un effondrement du  $\Delta\Psi_m$ . Afin de limiter la chute du gradient transmembranaire en  $H^+$ , l'ATP synthase va fonctionner en mode réverse et hydrolyser l'ATP favorisant ainsi sa déplétion. Parallèlement, l'ouverture du mPTP est à l'origine d'un gonflement matriciel, suite à l'entrée d'eau dans la mitochondrie, pouvant entraîner la rupture des membranes mitochondriales et la fuite, dans le cytoplasme, d'ions et produits matriciels/intermembranaires tels que le cytochrome c et l'AIF (apoptosis-inducing factor). La libération de ces facteurs pro-apoptotiques va déclencher la cascade de signalisation aboutissant à l'apoptose cellulaire. Cependant, lorsque la transition de perméabilité mitochondriale implique un grand nombre de mitochondries, la crise bioénergétique, l'épuisement en ATP et les troubles de l'homéostasie ionique qui s'ensuivent entraînent l'activation d'enzymes de dégradation (phospholipases, nucléases, protéases) contribuant *in fine* à la mort par nécrose des cardiomyocytes (Rasola & Bernardi, 2011; Rizzuto et al., 2012), caractérisée par la rupture de la membrane plasmique cellulaire.

Par ailleurs, bien que le rôle du mPTP dans les lésions d'IR soit bien documenté dans la littérature scientifique, son identité moléculaire demeure incertaine rendant plus difficile le développement de molécules thérapeutiques visant à inhiber son ouverture. Au cours des dernières décennies, la composition moléculaire du mPTP a suscité un grand intérêt et de nombreux modèles ont été proposés (Bernardi et al., 2022; Kwong & Molkenin, 2015). Initialement, il a d'abord été suggéré que le mPTP était composé de VDAC dans la membrane mitochondriale externe, de la translocase des nucléotides à adényliques (ANT) dans la membrane mitochondriale interne et de la CypD comme régulateur dans la matrice mitochondriale (Figure 14) (Crompton et al., 1998). Afin d'identifier le composant formant le canal du mPTP, plusieurs études ont évalué, indépendamment, l'impact de la délétion génique des différents composants du complexe sur la sensibilité du mPTP au  $Ca^{2+}$ . Il a été rapporté que le traitement à la CsA ou l'ablation génétique de la CypD augmente fortement la capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale mais n'empêche pas l'ouverture du mPTP suggérant que la CypD est un régulateur critique, mais pas une unité essentielle à la formation du pore du mPTP (Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). L'ablation de VDAC n'a quant à elle aucun impact sur l'ouverture du mPTP en réponse au  $Ca^{2+}$  ou au stress oxydatif (Baines et al., 2005). Par ailleurs, plusieurs études indépendantes ont rapporté que les inhibiteurs et les substrats de l'ANT affectaient considérablement la CRC des mitochondries et la sensibilité du mPTP au  $Ca^{2+}$  (Haworth & Hunter, 1979, 2000). Ainsi, l'hypothèse que l'ANT est le composant formant le canal du mPTP a

rapidement émergée. Cependant, ce n'est que récemment que ce modèle a été remis en question. En effet, des études ont rapporté que la délétion de l'ANT dans le foie de souris augmente considérablement la CRC des mitochondries et leur résistance à l'ouverture du mPTP induite par le  $Ca^{2+}$ ; néanmoins en réponse à des  $[Ca^{2+}]$  élevées, l'ouverture du mPTP est observée suggérant que l'ANT est un régulateur important du mPTP mais pas le composant formant le canal (Bround et al., 2020; Karch et al., 2019; Kokoszka et al., 2004). De manière intéressante, le traitement de ces mitochondries avec de la CsA inhibe complètement l'ouverture du mPTP (Karch et al., 2019). Les auteurs ont alors proposé l'existence de deux mPTP distincts : un premier qui serait formé par l'ANT et qui pourrait ou non être activé par la CypD et un second ne contenant pas l'ANT et dont l'activation exigerait la CypD (Karch et al., 2019). Cette nouvelle hypothèse a permis de relancer les tentatives d'identification de la composition moléculaire du mPTP et un nouveau modèle a ainsi émergé au cours de la dernière décennie (Karch & Molkenin, 2014). En effet, de nombreuses études ont récemment rapporté que le mPTP résulterait d'un changement de conformation de l'ATP synthase (Bernardi et al., 2023; Hurst et al., 2017). Cependant, alors que certaines études suggèrent que le pore du mPTP est formé par des dimères d'ATP synthase (Carraro et al., 2014; Giorgio et al., 2013) d'autres proposent que l'anneau c de l'ATP synthase compose le canal du mPTP (Alavian et al., 2014; Mnatsakanyan et al., 2019; Neginskaya et al., 2019). Par ailleurs, bien que cette découverte représente une avancée majeure dans l'identification moléculaire du mPTP, cela n'explique pas la régulation par tous les effecteurs connus du mPTP, tels que les inhibiteurs de l'ANT qui induisent un effet majeur sur l'activité du mPTP en modifiant l'état de conformation de l'ANT. Un consensus semble alors se dégager, en adéquation avec l'hypothèse de Karch et al, sur l'existence de deux conformations moléculaires différentes du mPTP : la première comprenant l'ANT et la seconde l'ATP synthase (Bernardi et al., 2022, 2023). L'idée de la double nature du mPTP a été renforcée par l'observation que l'élimination génétique de composants critiques de l'ATP synthase ne permet pas d'empêcher l'ouverture du mPTP, probablement à cause de la contribution de l'ANT dans la formation du pore (Carrer et al., 2021; Carroll et al., 2019; He et al., 2017). Ainsi, le modèle actuel du mPTP comprendrait l'ATP synthase et l'ANT dans la membrane interne mitochondriale, VDAC et les molécules pro-apoptotiques Bcl2-2 (Bax/Bak) qui faciliteraient la perméabilité à travers la membrane externe (Karch et al., 2013; Whelan et al., 2012), ainsi que le transporteur de phosphate (PiC) qui ne serait pas un composant direct du pore mais plutôt un régulateur de l'ouverture du mPTP via sa capacité à modifier les niveaux de Pi dans la matrice (Gutiérrez-Aguilar et al., 2014; Kokoszka et al., 2004) (Figure 14). D'ailleurs, l'ATP synthase, l'ANT et le PiC sont couplés à la fois physiquement et fonctionnellement pour la production d'ATP dans un supercomplexe de la membrane interne appelé ATP synthasome (Ko et al., 2003; Kwong et al., 2014).

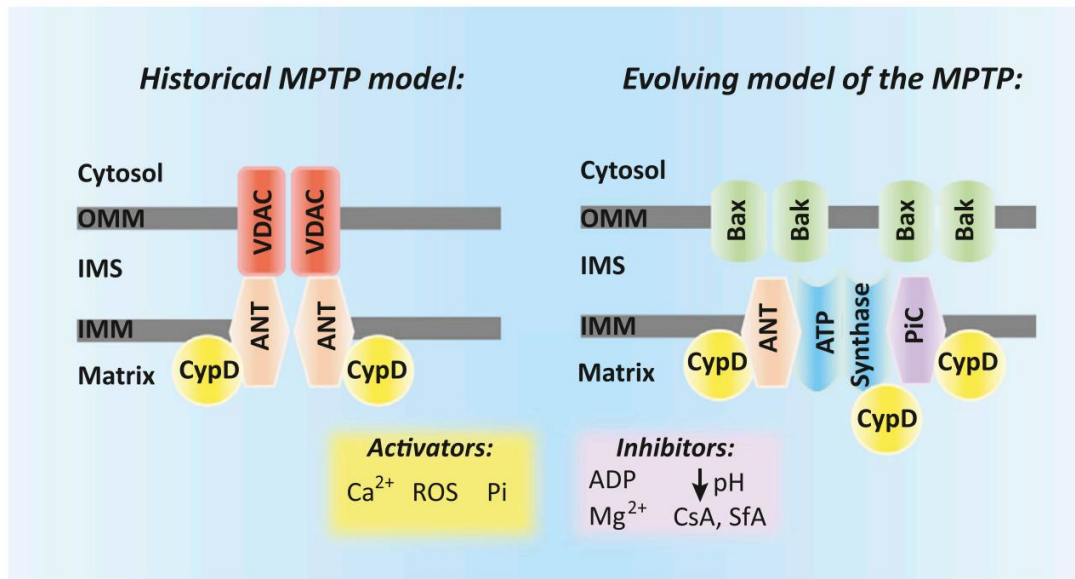


Figure 14 : Evolution du modèle concernant l'identité moléculaire du mPTP (Kwong et Molkenin, 2014)

Enfin, bien que le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'ouverture du mPTP ait été clairement démontré, les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris. Une grande partie de la difficulté à mieux comprendre le rôle des interactions entre le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'activation du mPTP semble être liée au manque de clarté concernant l'identité moléculaire du mPTP. Il a été démontré qu'une forte concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  induit une dé-acylation de la CypD sur la cystéine 202, rendant le résidu cystéine oxydable au cours des premières minutes de reperfusion. L'oxydation de la cystéine contribuerait à augmenter sa liaison avec l'ATP synthase et ainsi à activer le mPTP au cours de l'IR (Amanakis et al., 2021). Par ailleurs, il a été proposé que la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  directement sur la thréonine 163 de la sous-unité  $\beta$  de l'ATP synthase modifie sa conformation pour favoriser l'ouverture du pore. En effet, suite à la mutation de la T163, la sensibilité du mPTP pour le  $\text{Ca}^{2+}$  est diminuée (Giorgio et al., 2017). Enfin, il a été proposé que le  $\text{Ca}^{2+}$  en se liant aux cardiolipines, qui se trouve à proximité de l'ANT, puisse réguler la conformation de l'ANT et favoriser l'ouverture du mPTP (Brustovetsky & Klingenberg, 1996).

Pour finir, plusieurs études ont rapporté que l'ouverture du mPTP, à faible conductance et de manière transitoire puisse participer à différentes fonctions physiologiques telles que la production physiologique d'EROmt, l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  ou encore la régulation du métabolisme. Néanmoins la fonction biologique de ces ouvertures transitoires du mPTP fait à ce jour l'objet de nombreuses recherches et de débats actifs (Kwong & Molkenin, 2015; Mnatsakanyan et al., 2017). Il a notamment été rapporté que les ouvertures transitoires du mPTP pourraient être impliquées dans un processus mitochondrial complexe, appelé mitoflash, qui semble pouvoir lier des phénomènes transitoires de perte de  $\Delta\Psi_m$ , de production localisée d'EROmt et de mouvements de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang et al., 2008; Wei et al., 2011).

## e. Altérations de la dynamique mitochondriale lors de l'IR

Les cycles de fusion/fission mitochondriales permettent de réguler des processus cellulaires fondamentaux tels que l'homéostasie calcique ainsi que la production d'ATP et d'ERO ; cependant un déséquilibre entre la fission et la fusion est à l'origine de dysfonctions cellulaires participant à de nombreuses pathologies cardiaques. Dans le cadre de l'IR, la surcharge calcique cellulaire et la surproduction d'ERO, deux conditions favorisant l'activation de Drp1 (décrit précédemment Chapitre I/ II.1.d.iii), vont être à l'origine d'une fission mitochondriale excessive contribuant aux lésions d'IR.

Depuis plus d'une décennie maintenant, il est admis que l'infarctus du myocarde est associé à une fission exacerbée des mitochondries aboutissant à des mitochondries fragmentées et dysfonctionnelles (Disatnik et al., 2013; Ong et al., 2010; Sharp et al., 2014). Ce phénotype mitochondrial est observé dès 20 minutes d'ischémie suggérant que la fission mitochondriale est initialement activée au cours de l'ischémie puis maintenue pendant la reperfusion (Ong et al., 2010). De manière intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de Drp1 (le Mdivi-1 ou le P110) avant l'ischémie ou à la reperfusion, sur des modèles d'IR ex vivo et in vivo, permet de prévenir la surproduction d'EROMt, les altérations de l'homéostasie calcique, l'activation du mPTP et *in fine* réduit la taille de l'infarctus (Disatnik et al., 2013; Ong et al., 2010; Sharp et al., 2014). L'inhibition de la fission mitochondriale permet également de prévenir les altérations de la respiration mitochondriale et de la fonction cardiaque dans les semaines qui suivent l'infarctus (Disatnik et al., 2013). Ainsi, ces résultats suggèrent un rôle majeur de la fission mitochondriale médiée par Drp1 dans la surproduction d'ERO, les troubles de l'homéostasie calcique et *in fine* les lésions d'IR. Par ailleurs, en lien avec les travaux de Ong et al, l'administration de Mdivi-1 avant l'ischémie semble exercer un plus haut niveau de cardioprotection que l'administration lors de reperfusion, confirmant une activation du processus de fission mitochondriale dès la phase d'ischémie myocardique (Maneechote et al., 2018).

Il est aussi intéressant de noter que cette relation entre dynamique mitochondriale et  $[Ca^{2+}]_i$ /EROMt peut être bidirectionnelle. En effet, la surcharge calcique et le stress oxydant cellulaire contribuent à la fission mitochondriale au cours de l'IR. Ainsi, l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  au cours de l'IR conduit à l'activation de la CAMKII (Luo et al., 2019; Wang et al., 2022; Yu et al., 2019) et de la calcineurine (Parra et al., 2018; Sharp et al., 2014; Zaja et al., 2014) induisant la translocation de Drp1 vers la mitochondrie et ainsi la fission mitochondriale. De plus, la surcharge calcique cytosolique lors de la reperfusion peut également conduire à l'activation des calpaïnes, protéases dépendantes du  $Ca^{2+}$  et connues pour participer aux lésions d'IR (Inserte et al., 2012). Récemment, il a été rapporté qu'au cours de l'IR, l'activation des calpaïnes à la fois dans le cytoplasme et la mitochondrie est à l'origine

d'une régulation à la baisse de l'expression de la protéine de fusion OPA1, favorisant un phénotype mitochondrial fissionné (Guan et al., 2019). De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique du MCU permet de prévenir l'activation des calpaïnes, la translocation de Drp1 à la mitochondrie, la fission mitochondriale post-IR et *in fine* réduit la taille de l'infarctus (Guan et al., 2019). Par ailleurs, dans un modèle d'hypoxie-réoxygénation sur des cellules d'hippocampe, l'utilisation d'un inhibiteur du MCU, le Ru360, diminue la  $[Ca^{2+}]_m$  et l'expression des protéines Drp1 et Fis1 et prévient la fission mitochondriale (Zhao et al., 2015). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la surcharge cytosolique et mitochondriale joue un rôle non négligeable dans l'activation du phénomène de fission mitochondriale au cours de l'IR. Par ailleurs, les fuites calciques du RyR2 semblent également pouvoir contribuer à la fragmentation accrue des mitochondries au niveau cardiomyocytaire. En effet, les mitochondries cardiaques des souris contenant une mutation génétique à l'origine d'une déstabilisation de l'état fermé des RyR2 présentent une surcharge calcique et une surproduction d'ERO, associées à une fission exacerbée. Au contraire, la restauration de la stabilité de RyR2, ainsi que la surexpression de la catalase au niveau mitochondrial permettent de prévenir l'ensemble de ces dysfonctions mitochondriales, soutenant fortement un rôle clé de l'interaction complexe  $[Ca^{2+}]_m$ /EROMt dans la régulation de la dynamique mitochondriale (Santulli et al., 2015). Ces résultats sont en accord avec les études ayant rapporté que la surproduction d'ERO d'origine cytosolique (Abuarab et al., 2017; Hu et al., 2019) ou mitochondriale (Kleele et al., 2021; Wu et al., 2011) contribuent à la fragmentation mitochondriale ; cependant dans le cadre de l'IR cette relation reste à investiguer. Pour finir, dans une étude élégante utilisant la microscopie à super-résolution à illumination structurée (SIM), il a été rapporté que seules les fissions périphériques, reconnues comme le mode de fission menant à la mitophagie, étaient précédées par une diminution du  $\Delta\Psi_m$ , une surproduction d'EROMt et une surcharge calcique mitochondriale, bien avant la constriction médiée par Drp1. Ces dysfonctions mitochondriales ne sont pas observées lors des fissions médianes, décrites comme le mécanisme menant à la biogenèse mitochondriale (Kleele et al., 2021). Néanmoins, de nouveaux travaux seront nécessaires afin de mieux comprendre ces différences, notamment dans l'IR.

Ainsi, pour conclure, il semblerait qu'il existe au cours de l'IR une interaction complexe et bidirectionnelle entre fission et troubles  $[Ca^{2+}]_m$ /EROMt. En effet, la surcharge calcique et la surproduction d'ERO au cours de l'IR participent à l'exacerbation de la fission mitochondriale, qui elle-même semble pouvoir favoriser ce cercle vicieux entre altérations de l'homéostasie calcique et surproduction d'EROMt. Cette interrelation entre ces différents facteurs pourrait contribuer aux lésions myocardiques d'IR.

### Message à retenir

Il est aujourd'hui reconnu qu'au cours de l'infarctus du myocarde, le cercle vicieux entre la surproduction d'EROMt et la surcharge calcique mitochondriale est à l'origine de l'activation du mPTP, considéré comme l'acteur clé de la mort cellulaire au cours de l'IR. Plus récemment, le dérèglement au cours de l'IR de l'équilibre entre fission et fusion mitochondriale, au profit de la fission, est apparue comme un acteur majeur des dysfonctions mitochondriales et des lésions de reperfusion. En effet, il semble que les altérations de la dynamique mitochondriale, au sens de l'équilibre fusion/fission mais aussi des interactions entre mitochondries et organites, puissent interagir de manière bidirectionnelle avec le cercle vicieux  $[Ca^{2+}]_m$ /EROMt au cours de l'IR et ainsi contribuer à la souffrance et à la mort de la cellule.

## **Chapitre 2 : L'hyperglycémie comme facteur aggravant les lésions d'ischémie-reperfusion : mécanismes cellulaires et place de la mitochondrie**

### **I. Homéostasie glucidique et dysfonctions associées**

La régulation de la glycémie, c'est-à-dire de la concentration de glucose dans le sang, est un processus continu et dynamique, essentiel au maintien de l'équilibre physiologique de l'organisme. En effet, le glucose est considéré comme la principale source d'énergie cellulaire, voir l'unique source pour certains organes ou tissus tels que le cerveau, les globules rouges ou encore la région médullaire du rein. Ainsi, un approvisionnement continu en glucose est nécessaire pour assurer l'homéostasie cellulaire. Chez un individu sain, la glycémie est maintenue à une valeur relativement constante (entre 0,7g/l et 1.10g/l à jeun ; et jusqu'à 1,40 g/l 1h30 après un repas) grâce à l'action de deux hormones, l'insuline et le glucagon. L'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  des ilots de Langerhans du pancréas en réponse à une élévation de la glycémie, par exemple après un repas. En agissant sur ses récepteurs situés à la surface des cellules musculaires, hépatiques et adipeuses, l'insuline facilite l'entrée, l'utilisation ou le stockage du glucose dans les cellules. Le glucose peut être stocké à court terme sous forme de glycogène dans le foie et les muscles ou à plus long terme sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Le glucagon quant à lui est sécrété par les cellules  $\alpha$  des ilots de Langerhans en réponse à une diminution de la glycémie. La liaison du glucagon à ses récepteurs, présents uniquement à la surface des cellules hépatiques, favorise la dégradation du glycogène en glucose et sa libération dans le sang afin d'augmenter la glycémie et assurer un apport énergétique aux autres organes. Ainsi, le maintien de la glycémie est un mécanisme finement régulé, indispensable à l'homéostasie de l'organisme.

Par conséquent, un dysfonctionnement dans la régulation de la glycémie entraîne des complications pouvant être à l'origine de pathologies telles que le diabète. Le diabète est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie chronique résultant d'un défaut de sécrétion d'insuline et/ou de sa capacité d'action sur les cellules cibles. Le diabète est diagnostiqué lorsque la glycémie à jeun est égale ou supérieure à 1.26 g/l à deux reprises ou égale ou supérieure à 2 g/l à n'importe quel moment de la journée. On distingue principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 qui concerne environ 5-10% des diabétiques et le diabète de type 2 qui représente les 90-95 % restants (American Diabetes Association, 2014). Le diabète de type I est caractérisé par

une destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans suite à des réactions auto-immunes, aboutissant à la perte des capacités de sécrétion de l'insuline. Ce diabète, habituellement découvert chez les personnes jeunes, peut être corrigé par des injections d'insuline une à plusieurs fois par jour, d'où son nom de diabète insulino-dépendant. Au contraire, le diabète de type 2 est caractérisé par une incapacité d'action de l'insuline sur les cellules cibles (appelée insulino-résistance) associée à plus long terme à un déficit de la sécrétion d'insuline (insulinopénie) par les cellules  $\beta$ . En effet, afin de compenser la résistance des cellules à l'action de l'insuline et l'hyperglycémie associée, le pancréas va augmenter la production d'insuline mais cela va contribuer progressivement à son épuisement et à la diminution drastique de la production d'insuline. Contrairement au diabète de type 1, ce diabète survient généralement après l'âge de 20 ans et peut être prévenu par un changement du mode de vie. Récemment, une étude publiée dans *The Lancet* a rapporté que plus d'un demi-milliard de personnes sont diabétiques dans le monde (soit 6,1% de la population mondiale) et que ce nombre devrait plus que doubler pour atteindre 1.3 milliard de personnes au cours des 30 prochaines années (Ong et al., 2023). La prévention du diabète est un enjeu majeur de santé publique puisqu'en affectant l'ensemble des organes et tissus, il est à l'origine du développement de nombreuses pathologies dont les maladies cardiovasculaires.

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès chez les patients diabétiques (Seshasai et al., 2011). Les principales conséquences pathologiques du diabète découlent des effets de l'hyperglycémie chronique sur la macrocirculation (coronaropathie, artériopathie périphérique, maladie cérébrovasculaire) et la microcirculation (rétinopathie, néphropathie et neuropathies diabétiques). Ainsi, il a été rapporté que le risque de développer une maladie cardiovasculaire est deux à quatre fois plus élevé chez les patients diabétiques par rapport aux patients non diabétiques (Bertoluci & Rocha, 2017). De plus, les patients diabétiques ont une évolution clinique plus défavorable suite à un infarctus du myocarde (Donahoe et al., 2007), une angioplastie coronaire (Mathew et al., 2004) ou un pontage coronarien (Alserius et al., 2006) que les patients non diabétiques, suggérant une sensibilité accrue du cœur diabétique aux lésions d'IR. En revanche, les études expérimentales semblent moins concluantes ; 50 à 60% des études rapportent une augmentation de la taille de l'infarctus suite à une IR in vivo réalisée sur des modèles animaux de diabète de type I ou II tandis que les autres rapportent une absence de modification voire une diminution de la taille d'infarctus (Penna et al., 2020). La disparité entre les données cliniques et animales peut être expliquée par des différences dans les protocoles d'IR myocardique utilisés ou dans le choix des modèles d'animaux diabétiques.



## II. Impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR : mécanismes cellulaires sous-jacents

### 1. Métabolisme du glucose dans le cœur

Le cœur est un organe omnivore, adapté pour utiliser tous les substrats disponibles afin de subvenir à sa demande énergétique élevée (voir Chapitre 1/II.1.a). Il possède une flexibilité métabolique lui permettant de passer d'un substrat à un autre en réponse à des changements environnementaux tels que des perturbations aiguës de la charge de travail et/ou de la disponibilité en substrats. En effet, bien que les acides gras soient connus pour être le substrat préférentiel du cœur au repos, ce dernier privilégie le glucose dans des conditions de stress telles que l'ischémie ou l'hypertrophie pathologique (Shao & Tian, 2015; Tran & Wang, 2019). En effet, pendant l'ischémie, l'augmentation de la glycolyse anaérobie est le mécanisme majeur permettant au cœur de maintenir les concentrations d'ATP face à l'altération de la phosphorylation oxydative. L'absorption de glucose dans les cardiomyocytes est médiée par les transporteurs de glucose (GLUT) dont les isoformes les plus abondants sont GLUT1 et GLUT4. Alors que GLUT1 est l'isoforme majoritaire dans le cœur à l'état fœtal, GLUT4 devient prédominant dans les cardiomyocytes adultes (Depre et al., 1999; Tran & Wang, 2019). Par ailleurs, contrairement à GLUT4, GLUT1 ne semble pas dépendant de l'action de l'insuline (Depre et al., 1999; Shao & Tian, 2015). Ainsi, dans le cœur adulte, GLUT4 réside dans des vésicules intracellulaires en condition basale mais peut se transloquer vers la membrane plasmique en réponse à l'insuline, l'ischémie ou l'activité physique (Slot et al., 1991; Sun et al., 1994). Au contraire, GLUT1 est majoritairement localisé dans la membrane plasmique et assure l'absorption basale du glucose dans le cœur (Kraegen et al., 1993; Shao & Tian, 2015), bien qu'il puisse tout de même se transloquer en réponse à certains stimuli (Young et al., 1997).

Finalement, une fois entré dans la cellule, le glucose peut être phosphorylé en glucose 6-phosphate (G6P) par l'hexokinase ou converti en sorbitol par la voie des polyols. La majeure partie du G6P entre dans la voie glycolytique afin d'être converti en pyruvate qui sera oxydé par la suite dans les mitochondries ; cependant le G6P peut également entrer dans des voies métaboliques alternatives telles que la voie des pentoses phosphates (PPP) ou la voie de biosynthèse de l'hexosamine (HBP). Ainsi, en plus de fournir de l'énergie à cellule, la dégradation du glucose génère des intermédiaires métaboliques essentiels à l'homéostasie cellulaire. Par exemple, la voie HBP participe à la O-GlcNAcylation de protéines, une modification post-traductionnelle qui, en régulant la localisation, la stabilité et/ou l'activité de protéines cellulaires participe à des processus cellulaires clés (Battault et al., 2020; Shao & Tian, 2015). L'altération ou la prédominance de ces voies métaboliques alternatives

peuvent être associées à une perturbation des voies de signalisation cellulaire, de l'homéostasie ionique et redox ainsi qu'à un dysfonctionnement contractile.

## 2. Glucotoxicité cardiaque au cours de l'IR : mécanismes sous-jacents

L'hyperglycémie *per se* a émergée au cours de la dernière décennie comme un facteur prédictif de la sévérité des lésions cardiaques suite à un infarctus du myocarde (Penna et al., 2020). En effet, plusieurs études cliniques ont rapporté que la concentration de glucose dans le sang au moment de l'infarctus est positivement corrélée à la mortalité hospitalière (Ishihara, 2012; Kosiborod et al., 2005), ainsi qu'à la taille de la zone infarctée (Eitel et al., 2012; Mather et al., 2010). De manière intéressante, une étude rétrospective épidémiologique de grand ampleur, portant sur 141 680 patients a rapporté que l'hyperglycémie est plus délétère chez les patients non diabétiques par rapport aux patients diabétiques admis à l'hôpital avec une glycémie similaire (Kosiborod et al., 2005). En effet, la mortalité à 30 jours et à 1 an est nettement augmentée chez les patients non diabétiques (Figure 15). Ce constat clinique, confirmé depuis par d'autres études (Deedwania et al., 2008; Ishihara et al., 2009) demeure néanmoins complexe à interpréter. En effet, même si ce n'est pas toujours le cas, l'infarctus peut être à l'origine de la stimulation des terminaisons nerveuses sympathiques post-ganglionnaires entraînant la sécrétion de noradrénaline suivie par la libération d'adrénaline par la glande médullosurrénale (Schömig, 1990). L'adrénaline peut alors être à l'origine d'une stimulation de la glycogénolyse hépatique et musculaire, aboutissant à une augmentation de la concentration de glucose dans le sang. L'adrénaline va aussi inhiber l'activité des cellules  $\beta$  du pancréas, renforçant ainsi l'impact hyperglycémiant de l'adrénaline. Ainsi, il est aujourd'hui difficile de déterminer si la sévérité de l'infarctus va déterminer le niveau d'hyperglycémie et ainsi expliquer cette relation ou si l'hyperglycémie au cours de l'infarctus peut impacter le fonctionnement cellulaire et ainsi via une glucotoxicité aboutir à l'exacerbation de la sensibilité du cœur à l'IR. Il est néanmoins intéressant de noter que l'excès de consommation de boissons à riche teneur en sucre, telles que les sodas, est associée à une augmentation marquée de la mortalité cardiovasculaire (Ma et al., 2023), suggérant qu'indépendamment du diabète, la récurrence d'évènements hyperglycémiques au cours de la vie d'un individu pourrait impacter négativement son pronostic cardiovasculaire. Néanmoins, à notre connaissance aucune donnée n'existe sur le lien entre la consommation de ce type de boissons et la sévérité de l'infarctus. Par ailleurs, l'impact de l'hyperglycémie *per se* (i.e, indépendamment des complications liées au développement de la maladie métabolique, telles que l'inflammation à bas bruit, l'insulino-résistance ou -pénie et la cardiomyopathie diabétique) sur la vulnérabilité du cœur à l'IR a été bien démontré sur des modèles expérimentaux (Ham et al., 2019; Mapanga et al., 2014; Yang et al., 2009). En effet, sur un modèle d'IR in vivo sur rats et souris, l'injection de dextrose 30 minutes

avant l'ischémie, induisant rapidement une hyperglycémie supérieure à 300mg/dl, augmente considérablement la taille de la zone infarctée par rapport aux animaux normoglycémiques (Ham et al., 2019; Yang et al., 2009). De manière intéressante, dans un modèle similaire où l'injection de dextrose est réalisée 50 minutes avant l'ischémie, la normalisation de la glycémie grâce à une injection d'insuline 10 minutes avant l'ischémie ne permet pas de prévenir l'effet délétère de l'hyperglycémie sur les lésions d'IR (Yang et al., 2013). Cependant, bien que l'effet de l'hyperglycémie *per se* sur la vulnérabilité cardiaque à l'IR soit bien reconnu, les mécanismes sous-jacents restent aujourd'hui mal compris.

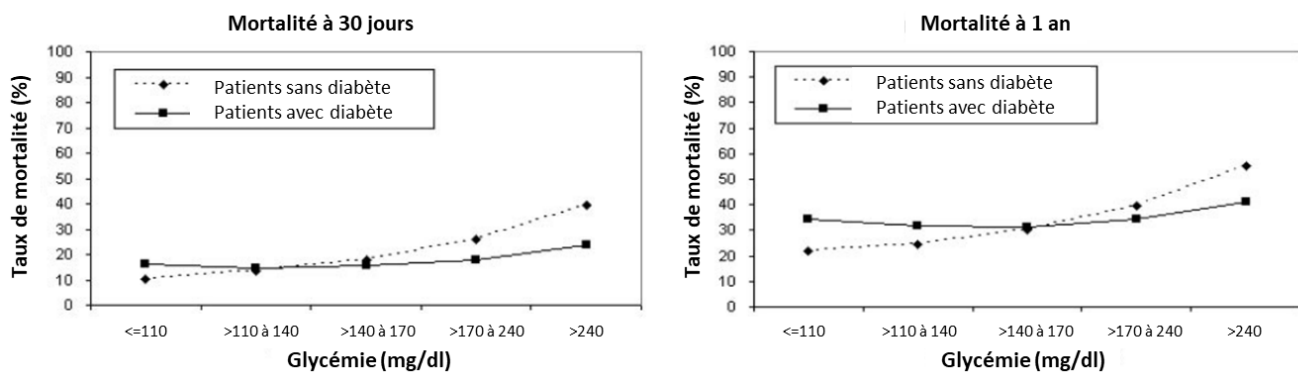


Figure 15 : Relation entre la glycémie lors de l'admission à l'hôpital et la mortalité à 30 jours et 1 an post-infarctus du myocarde chez des patients avec ou sans diabète diagnostiqué. (adaptée de Kosiborod et al, 2005).

Ainsi, en s'appuyant sur ces données cliniques et expérimentales, nous avons décidé, en adéquation avec la thématique de thèse, de centrer la suite de cette revue de la littérature sur les mécanismes cellulaires pouvant expliquer l'impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR, indépendamment des facteurs aggravants liés à l'installation de la pathologie diabétique.

Avant toute chose, il est important de spécifier que la majorité des études portant sur l'impact de l'hyperglycémie sur le cœur sont réalisées à des concentrations de glucose comprises entre 5mM (90mg/dl) et 11mM (198mg/dl) pour la condition normoglycémique et entre 20mM (360mg/dl) et 33mM (600 mg/dl) pour la condition hyperglycémique. La concentration à 11mM de glucose en normoglycémie est utilisée notamment en cœur isolé perfusé. Par ailleurs, la durée de l'hyperglycémie varie, selon les études, de quelques minutes à 48h d'incubation. Pour faciliter la suite de la lecture, nous avons décidé de parler d'hyperglycémie aiguë lorsque l'hyperglycémie dure de quelques minutes à quelques heures et d'hyperglycémie prolongée quand elle est égale ou supérieure à 24h. Pour finir, les modèles cellulaires utilisés sont également variables selon les études et sont dépendants de la durée d'incubation en hyperglycémie. Les hyperglycémies aiguës sont généralement rapportées dans des études utilisant des cardiomyocytes adultes fraîchement isolés alors que l'hyperglycémie

prolongée est retrouvée dans des études principalement sur des cardiomyocytes adultes en culture, et dans une moindre mesure sur des cardiomyocytes néonataux.

### a. Surproduction d'ERO : un élément clé de la glucotoxicité cardiaque

Il est maintenant bien établi que la surproduction ERO joue un rôle majeur dans le développement et la progression du diabète et dans les dysfonctions cardiaques associées (Bugger & Abel, 2014; Giacco & Brownlee, 2010; Kaludercic & Di Lisa, 2020). Cependant l'implication de l'hyperglycémie *per se*, indépendamment des autres complications du diabète, dans la surproduction d'ERO, les altérations cellulaires et la sensibilité du cœur à l'IR reste à investiguer.

Il y a plus de deux décennies maintenant, Brownlee a proposé pour la première fois que les dysfonctions cellulaires, observées en condition d'hyperglycémie, au niveau endothélial, pouvaient être expliquées par un mécanisme appelé « overfueling of the mitochondria », correspondant à une surproduction d' $O_2^{\bullet}$  par la CTE dont l'activité est augmentée en réponse à l'apport accru en glucose (Giacco & Brownlee, 2010; Nishikawa et al., 2000). Depuis, plusieurs études ont confirmé cette hypothèse au niveau cardiomyocytaire. Ainsi, Sedlic et al. (2017) ont rapporté sur cardiomyocytes isolés que l'hyperglycémie aiguë induit une augmentation rapide du métabolisme énergétique mitochondrial (observé par l'augmentation de la consommation d' $O_2$  et du  $\Delta\Psi_m$ ) associée à une surproduction d'ERO et à une ouverture précoce du mPTP. De manière intéressante, l'utilisation d'un découpleur mitochondrial, le DNP (2,4-Dinitrophénol), réduit fortement la production d'ERO, retarde l'activation du mPTP et prévient la mort cellulaire suite à un stress à l' $H_2O_2$ , suggérant un rôle majeur des EROmt dans les effets délétères de l'hyperglycémie (Sedlic et al., 2017). En lien avec ces résultats, l'utilisation de MitoTempo, un antioxydant mitochondrial, sur cardiomyocytes adultes permet de prévenir la production d' $O_2^{\bullet}$  et la mort cellulaire induites par 24 heures d'incubation en condition d'hyperglycémie (Ni et al., 2016). Ainsi, bien que le nombre d'études soit limité, l'hyperglycémie *per se* semble être à l'origine d'une production accrue d'ERO par les mitochondries cardiomyocytaires, participant *in fine* aux dysfonctions cellulaires. Cependant, alors qu'un traitement quotidien avec du MitoTempo chez des souris diabétiques permet de réduire la mortalité post-IR (Luo et al., 2013), le rôle de la surproduction d'EROmt dans la sensibilité accrue du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie reste à investiguer.

Par ailleurs, plusieurs études ont récemment rapporté que l'hyperglycémie pouvait induire des ERO indépendamment du métabolisme du glucose, remettant en question l'importance de la surproduction d'ERO d'origine mitochondriale dans la glucotoxicité cardiaque. En effet, la stimulation

ou l'inhibition de l'entrée de glucose dans la cellule, par l'utilisation d'insuline ou de phlorétine (inhibiteur des GLUT) respectivement, ne modifie pas la production d'ERO et la mort cardiomyocytaire induites par 2h et 24h d'hyperglycémie respectivement (Balteau et al., 2011). De plus, l' $\alpha$ -méthyl-D-glucose, un analogue du glucose non métabolisable imite les effets de l'hyperglycémie (Balteau et al., 2011; Van Steenberg et al., 2017). Ainsi, ces résultats suggèrent que d'autres sources génératrices d'ERO sont impliquées dans les effets délétères de l'hyperglycémie. Dans les modèles diabétiques, le rôle des NOX dans la surproduction d'ERO et dans les dysfonctions cardiaques est bien décrit (Li et al., 2010; Roe et al., 2011; Shen et al., 2009). De manière intéressante, des études récentes ont rapporté que l'hyperglycémie *per se* induit une surproduction d'ERO par la NOX2 (Balteau et al., 2011; Lu et al., 2020; Van Steenberg et al., 2017). L'activation de la NOX2 par l'hyperglycémie semble impliquer la O-GlcNAcylation de la CAMKII (Lu et al., 2020) ainsi que le transporteur SMIT1 (sodium myo-inositol transporter 1) (Van Steenberg et al., 2017). Ainsi, l'ablation du site de O-GlcNAcylation de la CAMKII ou la délétion totale de SMIT1 sur un modèle murin prévient l'activation de la NOX2 et la production d'ERO médiées par l'hyperglycémie aiguë (Lu et al., 2020; Van Steenberg et al., 2017). De plus, les cardiomyocytes exprimant un dominant-négatif d'une petite GTPase impliquée dans l'activation de NOX2, Rac1, présentent une diminution de l'activité de la NOX2 associée à une diminution de l'apoptose cellulaire suite à 24h d'hyperglycémie (Shen et al., 2009). Par ailleurs, la diminution du niveau d'expression de NOX4 sur cardiomyocytes isolés, réduit également la surproduction d'ERO suite à une hyperglycémie prolongée (Li et al., 2010). De manière intéressante, les NOX semblent également impliquées dans les effets délétères de l'hyperglycémie *per se* sur la vulnérabilité du cœur à l'IR. En effet, l'injection d'apocynine, un inhibiteur pharmacologique des NOX, 5 minutes avant l'induction de l'hyperglycémie (dextrose ; 30 min avant IR) normalise la taille d'infarctus suite à une IR in vivo (Yang et al., 2009). Par contre, lorsque l'injection d'apocynine est réalisée au moment de la reperfusion les effets délétères de l'hyperglycémie ne sont pas prévenus suggérant un rôle majeur des ERO produits par les NOX pendant la période d'hyperglycémie dans la sensibilité du cœur à l'IR (Yang et al., 2009).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle clé de la surproduction d'ERO, d'origine cytosolique et/ou mitochondriale dans la glucotoxicité cardiaque. De plus, la surproduction d'ERO par les NOX semble pouvoir jouer un rôle majeur dans la sensibilité accrue du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie.

Il est par ailleurs intéressant de noter que l'utilisation d'un peptide permettant d'inhiber l'activation de la NOX2 sur cardiomyocytes isolés incubés 24h en hyperglycémie prévient la production mitochondriale d' $O_2^{\bullet}$  (Ni et al., 2016). En adéquation avec ce résultat, les mitochondries cardiaques issues de souris diabétiques délétées en rac1 spécifiquement au niveau cardiaque présentent une production d'ERO diminuée, en comparaison avec les mitochondries issues de souris diabétiques

contrôles (Shen et al., 2009). De plus, un traitement chronique au mitoTempo sur des souris diabétiques prévient l'augmentation de l'expression de la NOX2 (Ni et al., 2016). Ces résultats suggèrent une interaction entre NOX2 et mitochondries, formant mutuellement une boucle de rétroaction positive qui amplifie la production d'ERO cellulaires en condition d'hyperglycémie. Ainsi, les ERO produits par la NOX2 pourraient être impliquées et précéder les dysfonctions mitochondriales observées en hyperglycémie. Cependant, l'existence et l'implication de ce cercle vicieux dans la vulnérabilité du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie aiguë reste à investiguer.

## **b. Troubles de l'homéostasie calcique**

Il est aujourd'hui bien reconnu que les patients diabétiques présentent des altérations de la fonction cardiaque, regroupées sous le nom de cardiomyopathie diabétique. L'hyperglycémie semble fortement corrélée à la prévalence de la dysfonction cardiaque diastolique et systolique (Aneja et al., 2008; Iribarren et al., 2001; Singh et al., 2018). Cette dysfonction contractile, confirmée chez des modèles expérimentaux de diabète semble résulter de troubles de l'homéostasie calcique. En effet, une instabilité de RyR2 (Yaras et al., 2005) une réduction de l'activité de SERCA et du NCX (Clark et al., 2003; Singh et al., 2018; Sorrentino et al., 2017) ainsi qu'une diminution de l'expression du MCU (Diaz-Juarez et al., 2016; Suarez et al., 2018) ont été rapportées dans des modèles murins de diabète. Cependant peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'hyperglycémie *per se* sur l'homéostasie calcique cardiomyocytaire et à son rôle dans la sensibilité accrue du cœur à l'IR.

Au niveau cardiomyocytaire, il a été rapporté que l'hyperglycémie aiguë induit rapidement une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  (Sims et al., 2014; Smogorzewski et al., 1998), prévenue par l'utilisation de vérapamil ou de nifédipine, des inhibiteurs des canaux calciques LTCC (Smogorzewski et al., 1998). L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  a également été observée suite à l'incubation de cellules Clone 9 en condition d'hyperglycémie (Yu et al., 2011). En adéquation avec ces résultats, sur cardiomyocytes isolés, l'hyperglycémie aiguë est à l'origine d'une augmentation de l'activité des calpaïnes associée à une augmentation de l'apoptose cellulaire (Li et al., 2009) ; ces deux phénomènes sont prévenus par l'inhibition des canaux LTCC ou du RyR2. Récemment, des études ont rapporté que l'hyperglycémie aiguë participe aux troubles de l'homéostasie calcique en augmentant les fuites calciques diastoliques du RS due à une instabilité du RyR2 (Hegy et al., 2021; Lu et al., 2020). Ce mécanisme, dépendant de l'activation de la CAMKII et de sa O-GlcNacylation, contribue à la genèse d'arythmies, observées sur cœur isolés perfusé en hyperglycémie (Erickson et al., 2013). L'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  et la dysfonction contractile observée en hyperglycémie semble également résulter d'une altération de la pompe SERCA (Tang et al., 2010; Zhang et al., 2012). En effet, les cœurs isolés perfusés 2h en

hyperglycémie présentent une augmentation de la production d' $O_2^{\bullet}$ , une oxydation accrue de SERCA associée à une diminution de son activité (Tang et al., 2010). Pour finir, l'hyperglycémie prolongée sur cardiomyocytes néonataux induit une diminution de l'expression du MCU à l'origine d'altérations métaboliques (Diaz-Juarez et al., 2016). En effet, la diminution de la  $[Ca^{2+}]_m$  induit une diminution du  $\Delta\Psi_m$ , de l'activité de la PDH et du stress oxydant cellulaire. Au contraire, la surexpression du MCU via un adénovirus sur cardiomyocytes isolés permet de prévenir la diminution de la  $[Ca^{2+}]_m$ , de rétablir les paramètres métaboliques et de diminuer le stress oxydant cellulaire et l'apoptose médiés par l'hyperglycémie (Diaz-Juarez et al., 2016). En lien avec ces résultats, la O-GlcNAcylation de protéines mitochondriales en réponse à une hyperglycémie prolongée a été associée à une altération de l'activité de la CTE, une diminution de la  $[Ca^{2+}]_m$  et du contenu en ATP cellulaire (Hu et al., 2009). Néanmoins, ces deux dernières études ont été réalisées sur des cardiomyocytes néonataux, quiescents et incubés pendant 48h ou plus en hyperglycémie. Ces résultats mériteraient donc d'être confirmés par des études sur des modèles plus proches de la physiologie cardiaque.

Ainsi, l'hyperglycémie *per se* semble être à l'origine de troubles de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire ; cependant leur implication dans la sensibilité accrue du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie n'a jamais été investiguée.

Par ailleurs, considérant le rôle majeur des interactions mitochondries-réticulum dans la surcharge calcique mitochondriale et la sensibilité du cœur à l'IR (voir Chapitre 1/II. 2.b), leur altération pourrait participer aux effets délétères de l'hyperglycémie sur la vulnérabilité du cœur à l'IR ; cependant à notre connaissance une seule étude s'est intéressée à l'impact de l'hyperglycémie sur les interactions mitochondries-réticulum. Ainsi, Wu et al. (2019) ont rapporté sur cardiomyocytes néonataux, que l'augmentation de l'expression de FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) et IP3R2 en réponse à 48h d'hyperglycémie est associée à une augmentation de l'interaction mitochondrie-réticulum et à une surcharge calcique mitochondriale (Wu et al., 2019). Par ailleurs, il est intéressant de noter que plusieurs études ont rapporté une modification des MAMs dans des modèles animaux de diabète ; les résultats sont néanmoins controversés. En effet, une réduction de l'interaction IP3R-VDAC associée à une diminution du transfert de  $Ca^{2+}$  entre le réticulum et la mitochondrie a récemment été observée dans un modèle murin de diabète de type 2 et semble constituer une caractéristique clé de la cardiomyopathie diabétique (Dia et al., 2020). Au contraire, d'autres études sur différents types de modèles murins diabétiques rapportent une augmentation des interactions réticulum-mitochondries et une surcharge calcique mitochondriale (Wu et al., 2019; Zhang et al., 2023). Ainsi, il apparaît que selon le modèle et la durée de l'induction du diabète, les interactions entre le réticulum et les mitochondries pourraient être impactées de manière différente.



### c. Altérations de la dynamique mitochondriale

Il a récemment été rapporté que la dysfonction contractile myocardique observée chez les patients diabétiques de type 2 était associée à une altération de la dynamique mitochondriale caractérisée par un phénotype mitochondrial majoritairement fragmenté et une diminution de l'expression de Mfn1 (Montaigne et al., 2014). En accord avec ce résultat, de nombreuses études expérimentales ont observé une augmentation de la fission mitochondriale cardiaque chez des modèles murins de diabète de type 1 et 2 (Boudina et al., 2007; Dabkowski et al., 2009; Liang & Kobayashi, 2016; Wu et al., 2019). De manière intéressante, l'hyperglycémie *per se* semble contribuer aux altérations de la dynamique mitochondriale cardiaque. En effet, plusieurs études sur cellules H9c2 ont rapporté que l'hyperglycémie aiguë et/ou prolongée induit une augmentation de la fission mitochondriale associée à une surproduction d'ERO, une ouverture précoce du mPTP et une augmentation de l'apoptose cellulaire (Yu et al., 2006, 2008, 2011). L'utilisation d'un mutant dominant négatif pour Drp1 ou la surexpression inductible de Mfn2 permet de prévenir l'ensemble des altérations cellulaires induites par l'hyperglycémie (Yu et al., 2006, 2008). Par ailleurs, une augmentation de la fission mitochondriale a également été observée sur des cardiomyocytes néonataux en réponse à une hyperglycémie prolongée (Kobayashi et al., 2020; Makino et al., 2011; Wu et al., 2021). Les effets de l'hyperglycémie sur la dynamique mitochondriale semblent être expliqués par des modifications du niveau de la O-GlcNAcylation de protéines impliquées dans la régulation de la fusion/fission mitochondriale. En effet, Makino et al. (2011) ont rapporté sur cardiomyocytes néonataux que l'hyperglycémie induit une augmentation de la O-GlcNAcylation de OPA1 associée à une diminution de son expression (Makino et al., 2011). La surexpression de la GlcNAcase, l'enzyme permettant de retirer le résidu O-GlcNAc, prévient la O-GlcNAcylation de OPA1 et la fission mitochondriale induite par l'hyperglycémie (Makino et al., 2011). En accord avec ce résultat, l'augmentation de la O-GlcNAcylation de Drp1, suite à une hyperglycémie de 72h, diminue la phosphorylation de Drp1 sur son site inhibiteur S637 favorisant ainsi la fission mitochondriale (Gawlowski et al., 2012). Ainsi, ces résultats suggèrent que la fragmentation mitochondriale participe à la glucotoxicité cardiaque. Néanmoins, bien que la dynamique mitochondriale soit plus difficile à observer sur cardiomyocytes adultes, des études sur ce type de modèle cellulaire plus proche de la physiologie cardiaque seraient nécessaires afin de confirmer ces résultats.

Pour finir, l'implication de la dynamique mitochondriale dans l'augmentation de la sensibilité du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie n'a été investiguée que sur des modèles murins de diabète. Ainsi, il a été rapporté que l'injection de Mdivi-1, inhibiteur de Drp1, sur des souris diabétiques, prévient la fission mitochondriale et la surproduction d'ERO post-IR et *in fine* réduit la



taille d'infarctus (Ding et al., 2017; Maneechote et al., 2020). L'inhibition de la fission mitochondriale permet également d'améliorer les fonctions mitochondriales et cardiaques suite à l'IR (Ding et al., 2017; Maneechote et al., 2020). Il est intéressant de noter que le Mdivi-1 exerce son effet cardioprotecteur à la fois lorsqu'il est injecté avant l'ischémie, au cours de l'ischémie ou au début de la reperfusion (Maneechote et al., 2020). Ainsi, l'altération de la dynamique mitochondriale induite par le diabète apparaît comme un acteur majeur dans l'augmentation de la sensibilité du cœur à l'IR ; néanmoins le rôle de l'hyperglycémie *per se* dans ce phénomène reste à investiguer.

### Message à retenir

Au cours des deux dernières décennies, l'hyperglycémie est apparue comme un facteur prédictif de la sévérité des lésions d'IR ; cependant les mécanismes cellulaires sous-jacents sont encore mal compris. La surproduction d'ERO par les NOX et les mitochondries semble jouer un rôle majeur dans la glucotoxicité cardiaque et ainsi dans la sensibilité accrue du cœur à l'IR. De manière intéressante, dans des modèles cellulaires, les altérations de l'homéostasie calcique et la fission du réseau mitochondrial ont été proposées comme des acteurs clés des effets délétères de l'hyperglycémie. Bien que l'utilisation d'inhibiteur de la fission mitochondriale soit à l'origine d'une diminution de la sensibilité du cœur à l'IR dans des modèles d'animaux diabétiques, le rôle de l'hyperglycémie *per se* dans ce phénomène reste à déterminer et les mécanismes cellulaires sous-jacents à investiguer.



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## I. Design expérimental

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la directive 2010/63/EU du parlement européen sur l'utilisation des animaux de laboratoire et approuvées par le comité d'éthique national N° CEEA-32041 et CEEA-27001.

### 1. Groupes expérimentaux

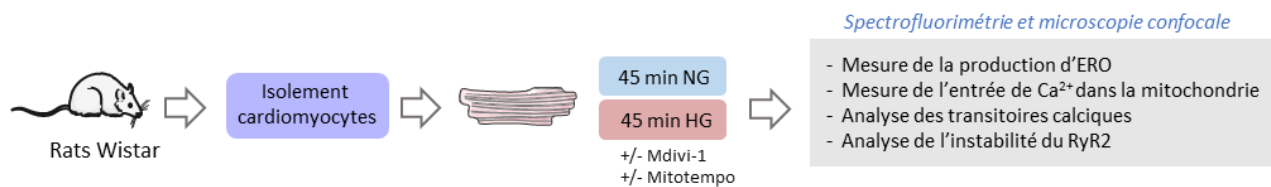
Tous les animaux ont été hébergés dans l'animalerie du Laboratoire de Physiologie Expérimentale Cardiovasculaire (LaPEC, UPR-4278) dans des conditions standards de température et d'humidité, et exposés à un rythme circadien de 12h de jour/ 12h de nuit. Les animaux ont disposé d'un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture et d'un enrichissement de leur milieu de vie. Dans cette étude, des rats Wistars mâles âgés de 12 semaines (poids : 250-275g ; Laboratoire Janvier) ont été utilisés.

Afin d'investiguer les mécanismes cellulaires sous-jacents expliquant l'augmentation de la sensibilité du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie, l'impact de l'hyperglycémie a été évaluée in cellulo, ex vivo et in vivo. Dans les deux premières conditions, l'hyperglycémie a été réalisée sur cœurs isolés perfusés et sur cardiomyocytes isolés à partir de rats contrôles. Au contraire, pour les expérimentations in vivo, les rats ont été répartis aléatoirement en 2 groupes expérimentaux : un groupe de rats normoglycémiques (NG) qui a reçu une injection de tampon citrate (véhicule) et un groupe de rats hyperglycémiques (HG) qui a reçu une injection de streptozotocine (STZ, 40mg/kg, Sigma Aldrich S0130) par voie intrapéritonéale. La STZ est une drogue qui induit une nécrose spécifique des cellules  $\beta$  du pancréas, provoquant rapidement une augmentation de la glycémie. Les expériences ont été réalisées 48h après l'injection de STZ afin de tenter de s'affranchir du développement de facteurs confondants à la cardiomyopathie diabétique et d'étudier uniquement les effets de l'hyperglycémie *per se*.

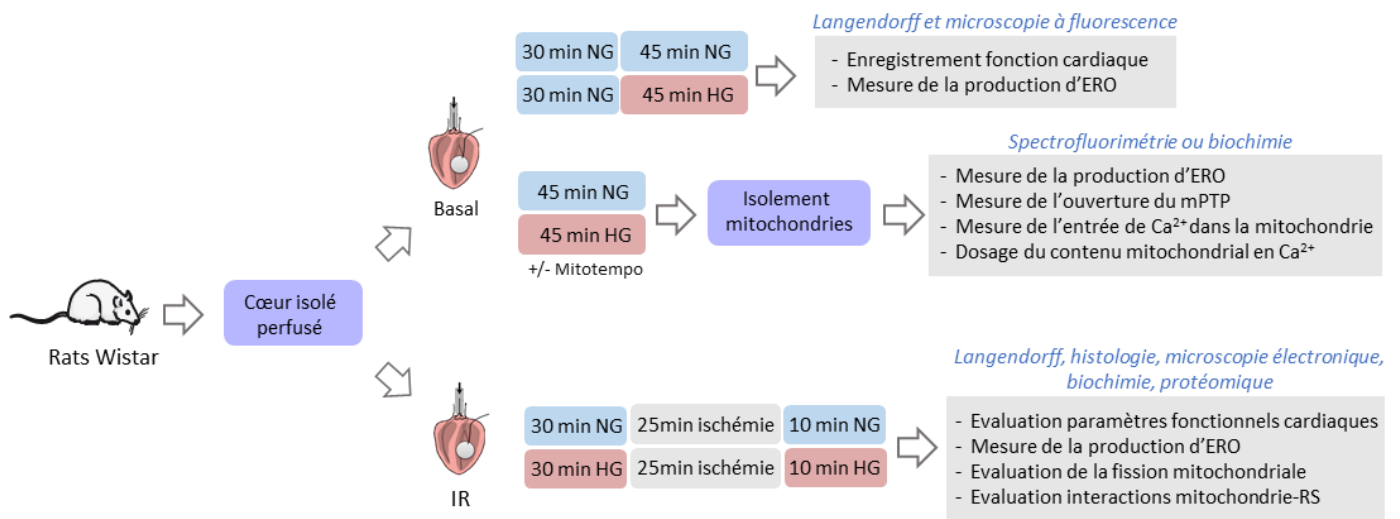
Afin d'évaluer dans un second temps le rôle de la voie DRP1 dans la sensibilité du cœur aux lésions IR, les rats préalablement traités ou non à la STZ ont reçu une injection intrapéritonéale de DMSO (véhicule) ou de Mdivi-1 (1,2 mg/kg dans du DMSO ; Sigma-Aldrich), un inhibiteur de Drp1, 24 heures et 1 heure avant l'expérimentation.

## 2. Organisation des expérimentations

### ① — In cellulo



### ② — Ex vivo



### ③ — In vivo



Figure 16 : Représentation schématique de l'organisation des expérimentations

## II. Evaluation des paramètres biologiques et physiologiques

### 1. Expérimentations suite à un protocole d'ischémie-reperfusion cardiaque

Afin d'évaluer l'impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR et le rôle de la voie Drp1 dans ce phénomène, une IR in vivo a été réalisée sur rats NG et HG traités ou non au Mdivi-1. Secondairement, la production d'ERO, la fission mitochondriale et les interactions mitochondries-RS dans les premières minutes de la reperfusion post-ischémique ont été évalués suite à un protocole d'IR réalisé sur cœur isolé perfusé de Langendorff.

#### a. Ischémie-reperfusion in vivo

L'IR in vivo a été réalisée sur des rats NG et HG ayant été traités ou non au Mdivi-1 (1,2 mg/kg) 24 heures et 1 heure avant la procédure. Pour cela, après anesthésie gazeuse à l'isoflurane, les rats ont été placés sur un tapis chauffant permettant de maintenir constante la température corporelle. Leur glycémie a été mesurée au niveau de la veine caudale à l'aide d'un glucomètre et seuls les animaux ayant une glycémie supérieure à 300 mg/dl ont été inclus dans le groupe HG. Une injection de buprénorphine par voie sous-cutanée (0,1mg/kg) a ensuite été réalisée. Afin de visualiser l'électrocardiogramme (ECG) des rats pendant toute la durée de l'expérimentation, trois électrodes ont été collées sur les pattes de l'animal et reliées à un boîtier d'acquisition (MP36; Biopac System Inc). Les rats ont ensuite été intubés par voie endotrachéale et ventilés mécaniquement (fréquence respiratoire : 60 respirations/min) avec un respirateur à volume cyclique (SAR-830 ; CWE) et enfin une thoracotomie latérale gauche a été pratiquée afin de visualiser le cœur. Après avoir agrandi la zone d'intérêt à l'aide d'un écarteur, le péricarde a été dilacéré permettant d'exposer le myocarde. L'artère coronaire descendante antérieure gauche a été visualisée puis un fil de soie (5-0 Ethicon) a été passé en dessous de celle-ci. L'occlusion coronaire a été réalisée à l'aide d'un tube de polyéthylène, placé à la surface du myocarde, exerçant une pression sur l'artère sous-jacente. L'occlusion coronaire a été maintenue pendant 30 minutes et validé par une modification du tracé de l'ECG (sus-décalage du segment ST). Le tube en polyéthylène a ensuite été retiré afin de permettre la reperfusion de la zone ischémisée, confirmée par la recoloration du tissu myocardique. Après 120 minutes de reperfusion, l'artère coronaire gauche a de nouveau été ligaturée en utilisant le nœud lâche laissé précédemment. Une solution de bleu Evans 5% a été injectée par la veine jugulaire afin de visualiser la zone à risque (ZAR). Pendant toute la durée de l'expérimentation, l'ECG a été enregistré et la fréquence cardiaque et l'intervalle QT (temps entre le début du complexe QRS et la fin de l'onde T) ont été ultérieurement

mesurés. Le QT corrigé (QTc) a été calculé selon la méthode de Framingham, dans laquelle l'intervalle QT est ajusté en fonction de la fréquence cardiaque :  $QTc = QT + 0,154 \times [1 - RR]$ .

### b. Evaluation de la taille d'infarctus

Suite à l'injection du bleu Evans, le myocarde a été prélevé et directement placé sur de la glace afin de stopper les battements autonomes. Une fois les tissus périphériques et les oreillettes retirés, le cœur a été conservé 1 heure au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  puis sectionné horizontalement en 4 tranches de l'apex au site d'occlusion (Figure 17). Afin de visualiser dans la ZAR l'aire de la zone infarctée et le tissu sain, les coupes de cœur ont ensuite été incubées dans du chlorure de triphényltétrazolium (TTC; 1%) pendant 15min, à  $37^{\circ}\text{C}$ , sous agitation. Le TTC est utilisé pour identifier les cellules métaboliquement actives. En effet, il est réduit par les déshydrogénases cellulaires en 1,3,5-triphénylformazan, un colorant de couleur rouge, dans les tissus vivants tandis qu'il demeure blanc dans les tissus nécrosés où ces enzymes ne sont plus efficaces. Ainsi, la zone blanche représente la zone infarctée, la zone rouge correspond à la zone ischémisée mais saine (la somme de la zone rouge et blanche correspond ainsi à la ZAR) tandis que la zone bleue indique le tissu non ischémisé. Après incubation, les tranches ont été placées dans une solution de formaline 10% pendant 24h, à l'obscurité, afin de fixer les colorations puis elles ont été photographiées. Pour chaque tranche, la surface du ventricule gauche (VG), de la ZAR et celle de la zone infarctée ont été mesurées par planimétrie à l'aide du logiciel d'analyse d'images Image J. Le pourcentage de la taille d'infarctus a été calculée ainsi :  $\text{Zone infarctée}/\text{ZAR} \times 100$ . Afin de vérifier la reproductibilité de la ligature coronaire, le ratio ZAR/VG a été calculé et comparé entre les différentes conditions.

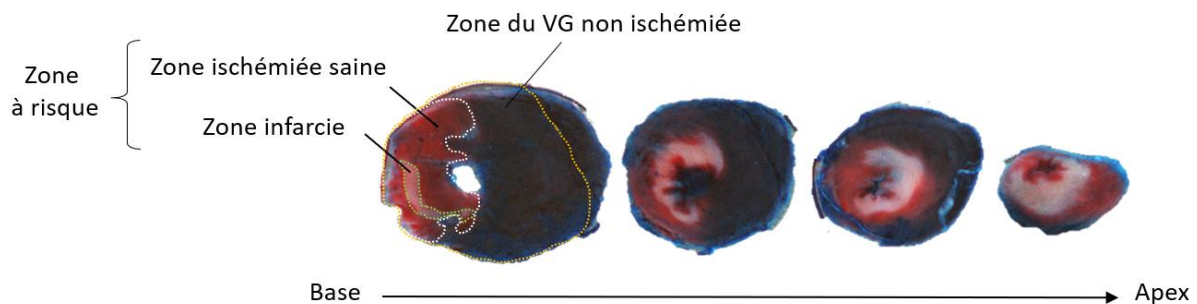


Figure 17 : Mesure des différentes zones d'intérêt sur les coupes de cœur post-IR après coloration au TTC et au bleu Evans



### c. Ischémie-reperfusion sur cœur isolé-perfusé

Après l'injection intraperitonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (120 mg/kg ; ip, Doléthol Vetoquinol), les rats ont reçu une injection d'héparine sodique (300 UI.kg<sup>-1</sup> ; Fisher Scientific), en intra-veineuse, afin d'éviter la formation de caillots sanguins au moment du prélèvement cardiaque. Après arrêt respiratoire de l'animal, une thoracotomie est rapidement réalisée et le cœur prélevé puis placé dans une solution glacée de Krebs-Henseleit (KH ; en mM: 118 NaCl, 11 D-glucose, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 4.7 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, and 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) afin de stopper les contractions cardiaques spontanées. Après avoir retiré les tissus périphériques, le cœur a été canulé par l'aorte sur un poste de cœur isolé de Langendorff puis perfusé de manière rétrograde, à pression constante (80 mmHg) avec une solution KH, chauffée à 37 °C et bullée au carbogène (95% O<sub>2</sub> ; 5% CO<sub>2</sub>). (Figure 18). Suite à cela, pour stopper les dépolarisations autonomes cardiaques, les oreillettes ont été retirées et le nœud auriculo-ventriculaire a été délicatement lésé par compression. Afin d'enregistrer la pression ventriculaire, un ballonnet en latex rempli d'eau, relié à un capteur de pression (MP36 ; Biopac System Inc) a été inséré dans le ventricule. Après avoir placé les électrodes dans la paroi myocardique, le cœur a été stimulé électriquement à une fréquence de contraction de 300 battements par minute (3V). Enfin, le volume du ballonnet a été réglé afin d'obtenir une pression télédiastolique de 5 mmHg. Une fois cette procédure réalisée, le cœur a été stabilisé pendant 30 minutes dans une solution KH contrôle (NG ; 11 mM D-glucose) ou hyperglycémique (HG ; 33 mM D-glucose) avant de subir une ischémie globale pendant 25 minutes correspondant à l'interruption totale de la perfusion cardiaque. Le cœur a ensuite été reperfusé pendant 10 minutes dans une solution KH NG ou HG puis rapidement prélevé. Une partie du VG a ensuite été placée dans de l'OCT (Optimal Cutting Temperature) et congelée dans de l'azote liquide afin de pouvoir évaluer ultérieurement la production d'ERO (voir II.1.d.) tandis que l'autre partie a directement été congelé afin d'être utilisée par la suite pour les expériences de biochimie (Western Blot, analyse protéomique). Dans certains cas, de fines bandelettes du sous-endocarde du VG ont été prélevés délicatement puis placés dans un tampon de fixation (2,5% de glutaraldéhyde/2% de paraformaldéhyde dans un tampon de cacodylate de sodium (0,1 M) afin d'être utilisés pour la microscopie électronique (voir partie II.1.f).

La pression intraventriculaire gauche a été enregistrée pendant toute la durée de la perfusion et a permis d'évaluer les paramètres fonctionnels cardiaques, tels que la pression systolique (P<sub>sys</sub> en mmHg), la pression diastolique (P<sub>diast</sub> en mmHg) et la pression développée (P<sub>dev</sub> en mmHg, définie comme la différence entre la P<sub>sys</sub> et la P<sub>diast</sub>). La contracture ischémique ainsi que le pourcentage de récupération fonctionnelle cardiaque après l'IR ont été déterminés (% récupération P<sub>dev</sub> = (P<sub>dev</sub> 10min Reperfusion/P<sub>dev</sub> basale) x 100.

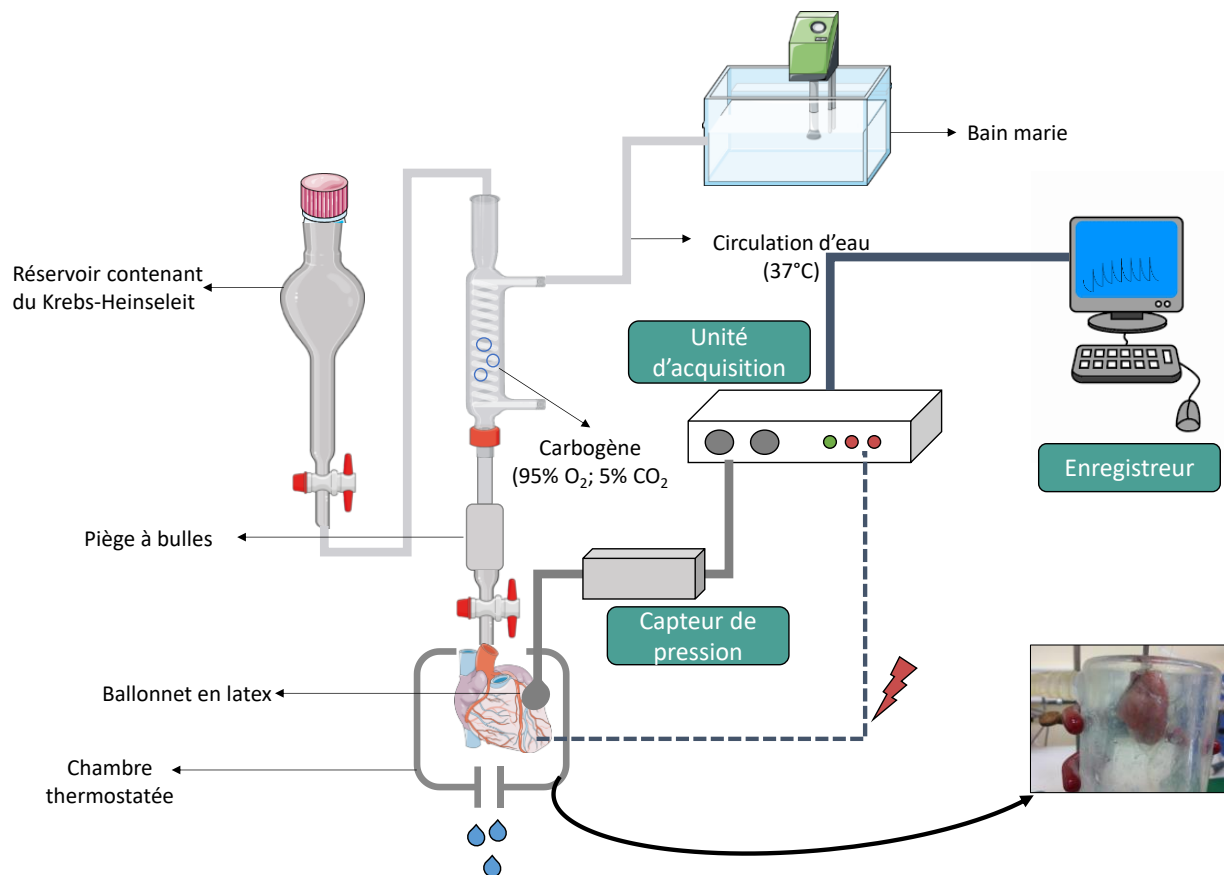


Figure 18 : Représentation schématique du poste de cœur isolé perfusé de Langendorff

#### d. Mesure de la production d'ERO post-IR

Suite au protocole d'IR réalisé sur cœur isolé perfusé, une partie toujours similaire du VG (ici la zone apicale) a été placée dans un moule en aluminium, recouvert d'OCT, puis congelée à l'azote liquide et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la réalisation des coupes histologiques. A l'aide d'un cryomicrotome (LEICA CM1950), des coupes de  $8\mu\text{m}$  ont été réalisées, déposées sur des lames puis immergées dans une solution contenant une sonde fluorescente sensible à l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ , le dihydroéthidium (DHE ;  $10\mu\text{M}$  ; excitation :  $488\text{ nm}$  ; émission :  $610\text{ nm}$ ), pendant 5 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  en condition humide. La DHE émet une fluorescence bleue dans le cytosol mais, une fois oxydée, elle migre vers le noyau pour s'intercaler dans l'ADN cellulaire où elle émet une fluorescence rouge. Afin de protéger l'échantillon de la lumière et d'éviter l'évaporation de la solution, l'expérimentation a été réalisée dans l'obscurité en condition humide. Après deux rinçages au PBS (Phosphate-Buffered Saline) pour éliminer l'excès de sonde fluorescente, les coupes de cœur ont été recouvertes d'une lamelle puis conservées à  $4^{\circ}\text{C}$ , à l'abri de la lumière, jusqu'à l'observation réalisée le jour même. Les photos ont été réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence (EVOS M5000 Invitrogen Thermo Fisher Scientific) puis traitées avec le logiciel Image J.

## e. Evaluation de la dynamique mitochondriale cardiaque post-IR

### i. Microscopie électronique à transmission

Ces expérimentations ont été réalisées en s'appuyant sur les compétences de la plateforme de microscopie  $\mu$ 3A (Avignon Université-INRAE) en collaboration avec l'ingénieur Isabelle Bornard. Suite à l'IR ex vivo, de fines bandes du sous-endocarde de coeurs NG et HG ont été prélevés délicatement puis fixés dans 2,5% de glutaraldéhyde/2% de paraformaldéhyde dans un tampon de cacodylate de sodium (0,1 M) pendant 2 heures à température ambiante, puis à 4 °C pendant la nuit. Après rinçage, les échantillons ont été post-fixés dans du tétroxyde d'osmium à 1% pendant 1 heure puis déshydratés par une série graduelle de bains d'éthanol et inclus dans de la résine. Des coupes ultrafines de tissus cardiaques ont ensuite été réalisées à l'ultramicrotome (Reichert Ultracut E) avec un couteau-diamant puis colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Les images ont été réalisées au microscope électronique à transmission (TEM Hitachi H7800 ; x 22) en sélectionnant aléatoirement des zones où les cardiomyocytes étaient disposés longitudinalement (Figure 19).

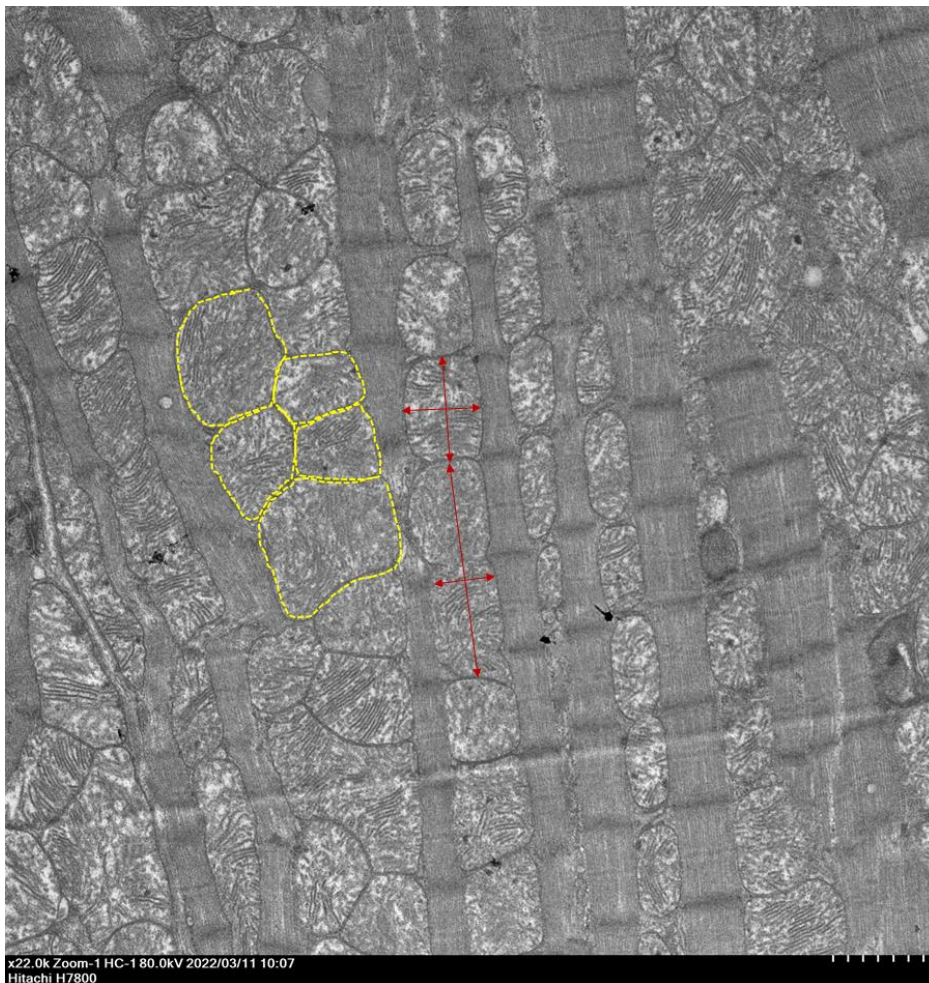


Figure 19 : Mesure de l'aire des mitochondries (jaune) et du rapport longueur/largeur des mitochondries (rouge) sur des coupes de tissus myocardiques imagées en microscopie électronique à transmission (plateforme  $\mu$ 3A)

La fission mitochondriale post-IR a ensuite été évaluée en mesurant manuellement l'aire des mitochondries et le rapport longueur/largeur des mitochondries à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 19). De plus, afin d'évaluer les interactions entre la mitochondrie et le RS post-IR, la distance entre les deux organites ainsi que la longueur de la zone d'interaction ont été mesurées manuellement à différents points à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 20). Les mitochondries gonflées dont la structure des crêtes mitochondriales était complètement altérée ont été exclues. Plus de 600 mitochondries provenant 3-4 cœurs indépendants par condition ont été analysées. Toutes ces mesures ont été réalisées à l'aveugle.

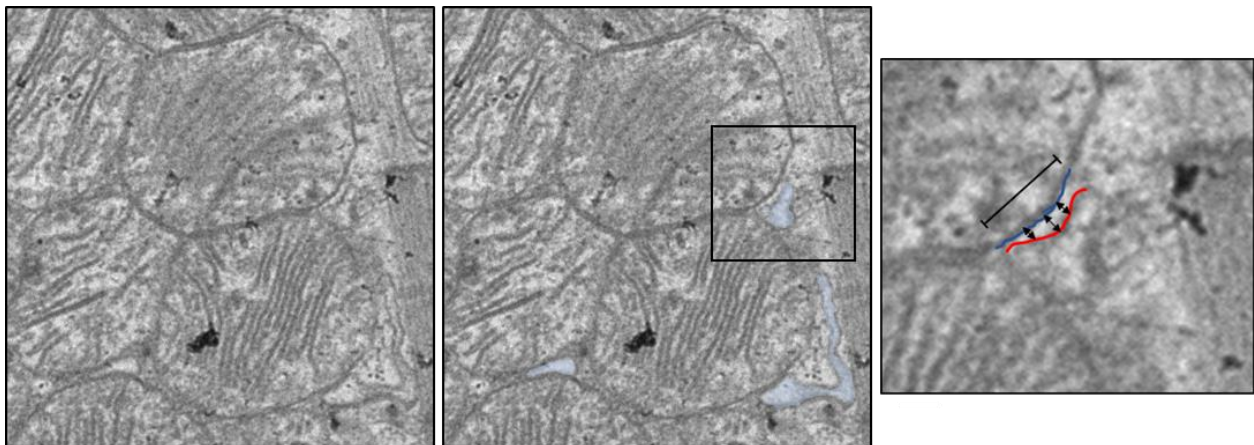


Figure 20 : Mesure de la distance (flèches noires) entre la mitochondrie (trait bleu) et le réticulum sarcoplasmique (trait rouge) ainsi que de la longueur de la zone d'interaction (trait noir) sur des coupes de tissus myocardiques imagées en microscopie électronique à transmission (plateforme  $\mu$ 3A)

## ii. Western Blot

Suite au protocole d'IR ex vivo, l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la dynamique mitochondriale a été évaluée par Western Blot sur la fraction mitochondriale et cytosolique d'homogénats de VG issus des cœurs NG et HG. Pour cela, les VG ont été broyés à l'aide d'un Ultra Turrax (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik) dans 1.2 mL de tampon H (0,3 M Saccharose, 5 mM TES, 0,2 mM EGTA, 1 mg/mL BSA, pH : 7,2 ajusté avec KOH) sur la glace, à 4 °C. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 1 000 g pendant 10 minutes à 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré puis de nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C afin d'isoler les mitochondries. Le culot, correspondant à la fraction enrichie en mitochondrie a ensuite été resuspendu dans 300  $\mu$ L de tampon H tandis que le surnageant correspondant à la fraction cytosolique a été conservé. Les protéines mitochondriales et cytosoliques ont ensuite été dosées avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid, Pierce BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific) puis la concentration a été ajustée à 2mg/mL dans du tampon d'extraction SB (50 mM de Tris-HCl à pH 5,7, 10% de glycérol, 1% de Sodium Dodécyl Sulfate) contenant des inhibiteurs de phosphatases NaOV



(Fisher Scientific) et de protéases (Sigma Adrich). Afin de suivre la migration des protéines, 2% de bleu de bromophénol ont été ajouté aux échantillons. Ces derniers ont ensuite été dénaturés suite à l'ajout de  $\beta$ -mercapto-éthanol (5%) et l'incubation à 95 °C pendant 5 minutes. Les protéines mitochondriales et cytosoliques ont ensuite été séparées indépendamment par électrophorèse sur des gels de dodécylsulfate de sodium polyacrylamide (SDS-PAGE) à 10%. Les protéines ont ensuite été 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 de transfert (Trans-Blot Turbo ; Bio-rad Laboratories). Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de blocage, composée de TBS-T (Tris-Buffered Saline, 0,05% de Tween 20, pH 7,5) et de lait (10%) ou de BSA (3%) selon la protéine étudiée, afin de saturer les sites non spécifiques. Finalement les membranes ont été incubées 12 heures sous agitation à 4 °C, avec un anticorps primaire, reconnaissant la protéine d'intérêt : DRP1 (anti-mouse ; 1:1000 ; Cell Signaling), DRP1 phosphorylée sur S616 (DRP1P-S616 ; anti-rabbit ; 1:500, Cell Signaling), DRP1 phosphorylée sur S637 (DRP1P-S637 ; anti-rabbit ; 1:1000, Cell Signaling), VDAC1 (anti-mouse ; 1:30000, Cell Signaling) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ; anti-rabbit ; 1:3000 ; Santa Cruz). Après rinçages au TBS-T, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps utilisé, pendant 1 heure à température ambiante. A nouveau, les membranes ont été rincées 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 pendant 5 minutes. L'immunodétection a été réalisée à l'aide du système de chimiluminescence ECL (VILBER Fusion FX). Les résultats ont ensuite été analysés grâce au logiciel Image J.

### iii. Analyse « shotgun » protéomique par nLC-MS/MS

Une analyse protéomique « shotgun » a été réalisée afin d'identifier et de quantifier les protéines présentes dans les fractions mitochondriales isolées à partir des cœurs ayant subi l'IR en NG ou HG. L'isolement des mitochondries puis l'extraction et le dosage des protéines mitochondriales ont été réalisés au LaPEC, tandis que la préparation des échantillons ainsi que l'analyse « shotgun » protéomique par nano-chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été réalisés au Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (SPI/LI2D, Palteforme ProGénoMix, CEA Marcoule). Ces expérimentations ont été réalisées sous la direction de Jean Armengaud (DR CEA) et Béatrice Alpha-Bazin (DR CEA).

En bref, les mitochondries cardiaques ont été isolées (voir partie II. 3.a.) à partir des cœurs perfusés en NG ou HG et soumis à l'IR ex vivo. Après les centrifugations différentielles, le culot de protéines mitochondriales a été remis en suspension dans du tampon HENS (100mM Hepes, 1mM EDTA, 0,1mM Neocuproïne, 1% SDS, 100mM NEM ; pH=6). Ensuite, trois cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide suivi d'une agitation vigoureuse au vortex ont été réalisés afin de rompre les membranes mitochondriales. Les fragments lipidiques non dissous ont été recueillis par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant, contenant les protéines mitochondriales a été collecté et la concentration en protéines a été déterminée avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid, Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Les échantillons protéiques ont ensuite été dilués à 1,25 µg/µL dans un tampon d'échantillonnage NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50mM/LDS 4X (3/1) et chauffés à 99°C pendant 5 minutes. Pour chaque échantillon, 25 µg de protéines ont été chargés sur des gels NUPAGE 4-12% Bis-Tris (ThermoFisher scientific) pour une migration électrophorétique de 6 minutes à 200V dans un tampon MES/SDS 1X. Après coloration du gel avec du « Simply Blue Safestain », chaque bande de polyacrylamide correspondant à l'ensemble du protéome soluble a été récupérée et traitée pour une digestion à la trypsine dans le gel comme décrit précédemment (Hartmann et al., 2014, Clair et al. 2012). La nano-chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nLC-MS/MS) a ensuite été réalisée au sein de la Palteforme ProGénoMix, CEA Marcoule par Jean-charles Gaillard sous la supervision de Béatrice Alpha-Bazin.

Pour finir, les fichiers bruts générés par le spectromètre de masse Q-Exactive HF ont été analysés avec le logiciel Proteome Discoverer v1.3 (Thermo Fisher Scientific) afin d'interpréter les spectres MS/MS. Les listes de pics ont été générées automatiquement avec le filtre d'importation des données « extract\_msn.exe » (Thermo Fisher Scientific) du package Xcalibur FT (version 2.0.7 ; Thermo Fisher Scientific). Les spectres MS/MS ont été comparés à la base de données des séquences protéiques de référence de *Rattus norvegicus* (25 738 entrées protéiques totalisant 15 592 510 résidus d'acides aminés ; téléchargées à partir de NCBI le 1er novembre 2019) avec le logiciel Mascot Daemon (version 2.6.1 ; Matrix Science). Toutes les correspondances peptidiques avec un score peptidique MASCOT inférieur à une valeur p de 0,05 ont été filtrées et attribuées à une protéine selon le principe de parcimonie. Seules les protéines comportant au moins deux peptides ont été prises en compte dans l'étude. Les correspondances peptide-spectre ont été comptées pour chaque protéine en vue d'une quantification sans étiquette (Spectral Counting, spectral counts, SC). L'abondance des protéines entre les groupes a été comparée avec le test T-Fold (Carvalho et al. 2012) via un test t considérant des échantillons avec une variance inégale et une répartition bilatérale.

## 2. Expérimentations sur cardiomyocytes isolés

Le travail sur cardiomyocytes isolés a permis grâce à l'utilisation de sonde fluorescente spécifique des ERO (DHR123), du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Fluo-4) et du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial (Rhod2) d'évaluer l'impact de nos conditions expérimentales sur la production d'ERO et l'homéostasie calcique cellulaire.

### a. Isolement de cardiomyocytes

Le protocole d'isolement de cardiomyocytes, basé sur la digestion enzymatique de la matrice extracellulaire, a été réalisé tel que décrit par Wolska and Solaro, 1996. L'avantage d'utiliser des cardiomyocytes isolés est de pouvoir travailler sur des cellules ayant conservées le phénotype et la physiologie cellulaire de l'organe d'origine. Ainsi, le cœur a été hépariné puis prélevé de la même manière que pour le cœur isolé perfusé, puis rincé dans une solution glacée de Krebs-Hepes dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$  (en mM : 117 NaCl, 5,7 KCl, 4,4  $\text{NaHCO}_3$ , 1,5  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,7  $\text{MgCl}_2$ , 21 HEPES, 6 glucose, 20 taurine, pH à 7,15). Le cœur a ensuite été canulé de manière rétrograde sur un système de perfusion, de la même manière que lors du montage sur le poste de Langendorff, puis perfusé à 37°C pendant 5 minutes avec la solution de Krebs-Hepes afin de le rincer. Enfin, le cœur a été perfusé pendant environ 20 minutes avec une solution de dissociation composée de Krebs-Hepes et de collagénase de type IV (0,8 mg/mL, Worthington, SERLABO, Entraigues, France). A la fin de la digestion enzymatique, le VG a été disséqué, sectionné en petits morceaux et placé dans une solution de Krebs-Hepes contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA, 15 mM) afin de bloquer l'action de la collagénase et du butanédione monoxine (BDM, 10 mM), un inhibiteur réversible de la myosine ATPase, empêchant ainsi la contraction des cellules. Les cardiomyocytes ont ensuite été dissociés mécaniquement à l'aide d'une pipette pasteur puis filtrés afin d'éliminer les tissus non dissociés. La solution de cardiomyocytes isolés a ensuite été soumise à un processus progressif de « remontée calcique » correspondant à une succession de bains contenant des concentrations croissantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (0mM, 0,3mM, et 1mM) et des concentrations de BDM décroissantes (10 mM, 6mM ; 0mM). Les cardiomyocytes ont ensuite été conservés à 37 °C dans la solution à 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  jusqu'aux expérimentations. L'état des cellules a été visualisé au microscope et leur nombre a été estimé grâce à une lame de Malassez. Seuls les isollements avec un minimum de 150 000 cellules vivantes par mL étaient utilisés dans la suite des expérimentations. Les cellules sont utilisées dans la journée.

## **b. Mesure de la production d'ERO cardiomyocytaire**

Les cardiomyocytes isolés au préalable (100 000 cellules/mL) ont été incubés 30 minutes à 37°C dans une solution de Krebs-Hepes à 1mM Ca<sup>2+</sup> contenant une sonde fluorescente sensible aux ERO, la dihydrorhodamine 123 (DHR123 ; 5µM ; excitation : 508nm ; émission : 529nm ; Fisher Scientific, Invitrogen). Après incubation, les cellules ont été rincées avec du Krebs-Hepes afin d'éliminer l'excès de sonde fluorescente, puis incubées dans du Krebs-Hepes 1,8mM Ca<sup>2+</sup> normoglycémique (NG ; 6mM) ou hyperglycémique (HG; 33mM) pendant 45min. Dans certaines conditions, les cardiomyocytes ont également été traités, pendant l'incubation, avec un inhibiteur de la fission mitochondriale, le Mdivi-1 (50µM ; Sigma Aldrich M0199), ou un inhibiteur spécifique de NOX2, le GSK-2795039 (25µM ; MedChem HY-18950) pendant 30 min à 37°C. Pour finir, certains cardiomyocytes ont été incubés pendant 45 minutes dans une solution de Krebs-Hepes contenant du L-glucose (11mM D-glucose + 22 mM L-glucose), utilisé comme contrôle osmotique. La production d'ERO par les cardiomyocytes a été évaluée par spectrofluorimétrie au lecteur microplaque (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX), en condition basale ainsi qu'après un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100µM ; Sigma Aldrich) afin de mimer un stress oxydatif de reperfusion.

## **c. Mesure de l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans les mitochondries cardiomyocytaires**

Les cardiomyocytes isolés au préalable (100 000 cellules/mL) ont été incubés 30 minutes à 37°C dans une solution de Krebs-Hepes à 1mM Ca<sup>2+</sup> contenant une sonde fluorescente sensible au Ca<sup>2+</sup> mitochondrial, Rhod2-AM (5 µM ; excitation : 553nm ; émission: 576nm ; Abcam) et 0,02% d'acide pluronique (Fisher Scientific, Invitrogen), utilisé pour faciliter la solubilisation de la sonde fluorescente. Après incubation, les cellules ont été rincées avec du Krebs-Hepes pour éliminer la sonde Rhod-2 libre puis incubées dans du Krebs-Hepes NG ou HG (1,8mM Ca<sup>2+</sup>) pendant 45min à 37°C. Certains cardiomyocytes ont été incubés dans une solution de Krebs-Hepes contenant du mannitol (11mM D-glucose + 22 mM mannitol), utilisé en tant que contrôle osmotique. La colocalisation entre le signal issu de la sonde Rhod-2 et le signal obtenu avec le Mitotracker Green a été vérifiée afin de valider la localisation mitochondriale de la sonde Rhod-2 (Figure 21).



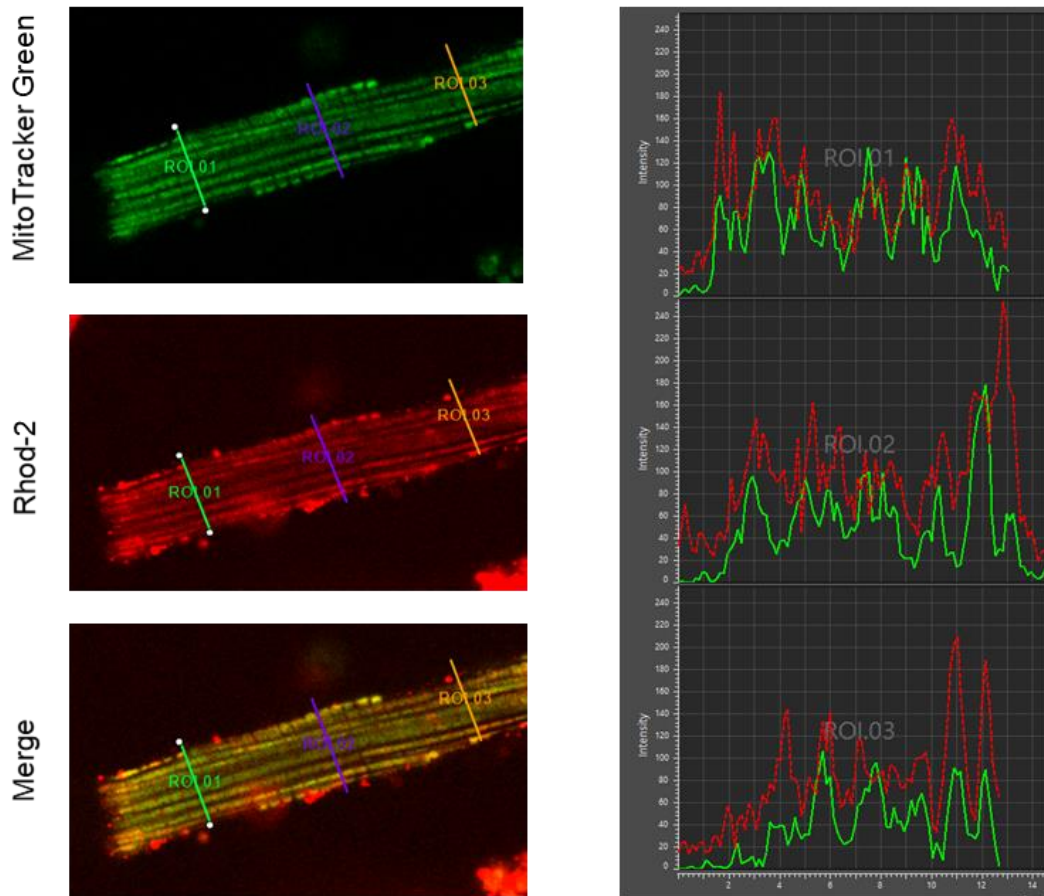


Figure 21 : Colocalisation entre la sonde Rhod-2 et le Mitotracker Green

L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie a été stimulée par un stress à l'isoprotérénol (ISO,  $1\mu\text{M}$  ; Sigma Aldrich I5627) ou à l'histamine ( $500\mu\text{M}$  ; Sigma Aldrich H7250) afin d'induire respectivement la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par les RyR2 ou les IP3R. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries a également été mesurée suite à une stimulation par des électrodes de champ (Myopacer, Ionoptix). Dans ce cas, les cardiomyocytes ont été stimulés ( $19\text{V}$ ) à  $0,5\text{Hz}$  pendant 30 secondes suivies de 30 secondes à  $4\text{Hz}$  afin de favoriser l'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale (Figure 22). Le FCCP ( $100\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich), un puissant découpleur de la phosphorylation oxydative, ou le RU360 ( $10\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich 557440), inhibiteur du MCU, ont été utilisés pour confirmer que la fluorescence émise par Rhod2 peut être utilisée comme un indicateur fiable des changements de  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial. Les variations de fluorescence ont été mesurées par microscopie confocale (LEICA DMI8, objectif x63) en mode line-scan au sein de la plateforme de microscopie 3A (INRAE-Avignon Université) ou à l'aide d'un lecteur microplaques (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX).

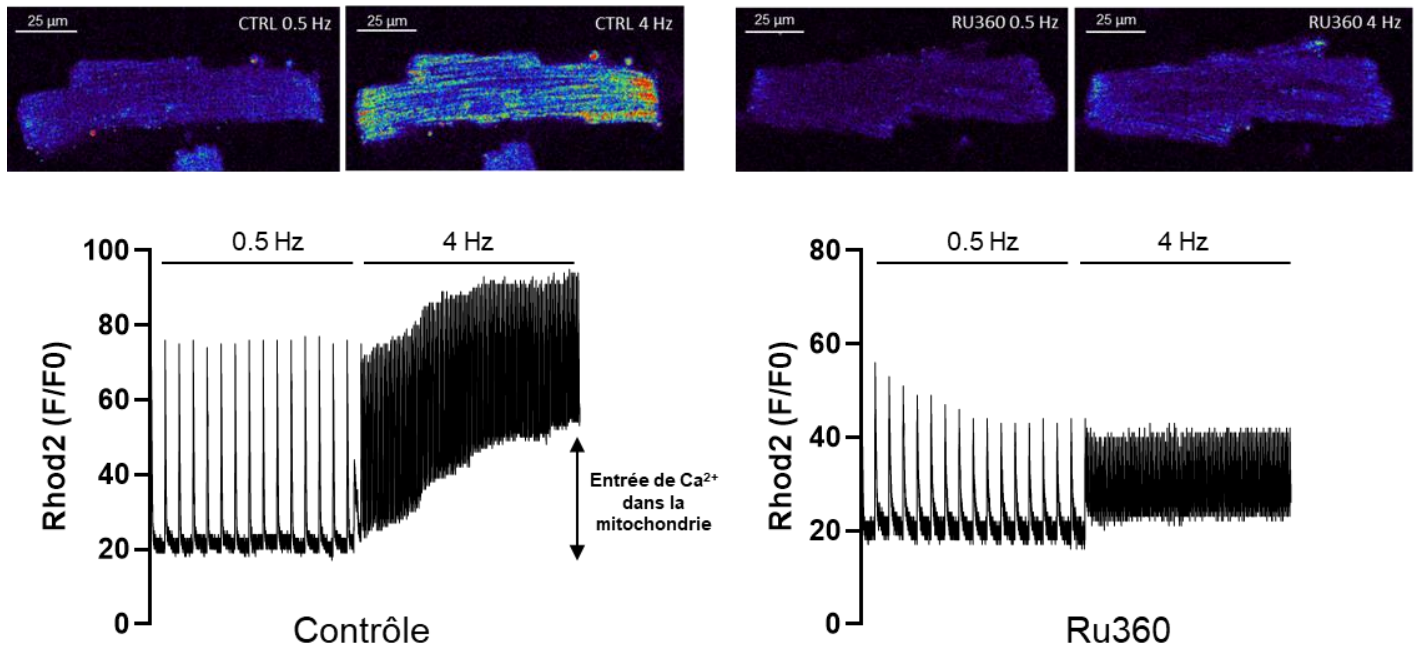


Figure 22 : Mesure de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie sur cardiomyocytes isolés stimulés électriquement (électrodes de champ, Myopacer IONOPTIX)

#### d. Mesure des transitoires calciques et des vagues calciques spontanées

L'imagerie calcique a été réalisée par microscopie confocale au sein de la plateforme de microscopie 3A (INRAE-Avignon Université). Pour cela, les cardiomyocytes isolés au préalable (100 000 cellules/mL) ont été chargés avec la sonde fluorescente sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, Fluo-4 AM (10  $\mu\text{M}$ , excitation : 494nm ; émission : 516nm ; Fisher Scientific Invitrogen) solubilisé dans une solution de Krebs-Hepes à 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pendant 30 min à 37°C, en présence de 0,02% d'acide pluronique. Après incubation, les cellules ont été rincées avec du Krebs-Hepes 1,8mM  $\text{Ca}^{2+}$  pour éliminer l'excès de sonde puis incubées dans du Krebs NG ou HG (1,8mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) pendant 45min à 37°C. Certains cardiomyocytes ont été incubés pendant 45 minutes dans une solution de Krebs-Hepes contenant du mannitol (11mM D-glucose + 22 mM mannitol), en tant que contrôle osmotique. Les cardiomyocytes ont été traités ou non avec du Mitotempo (1 $\mu\text{M}$  ; Sigma Aldrich SML0737) ou du Mdivi-1 (50 $\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich) pendant 30 min à 37°C. Afin d'enregistrer les transitoires calciques, les cardiomyocytes ont été stimulés électriquement (19V ; Myopacer, système Ionoptix) à une fréquence de 0.5Hz pendant 30sec, suivi de 30sec à 2Hz. La stimulation électrique a ensuite été interrompue pour enregistrer les vagues calciques spontanées, utilisées comme un indice de l'instabilité du RyR2 (Figure 23). Un stress à l'isoprotérénol (ISO) a également été effectué dans certaines conditions. Les enregistrements ont été obtenus grâce à un microscope à fluorescence confocale (LEICA DMI8), en mode line-scan, objectif x63. L'analyse des

transitoires (amplitude du transitoire et cinétique de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ , Tau) et des vagues calciques a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Leica Application Suite X (LASX).

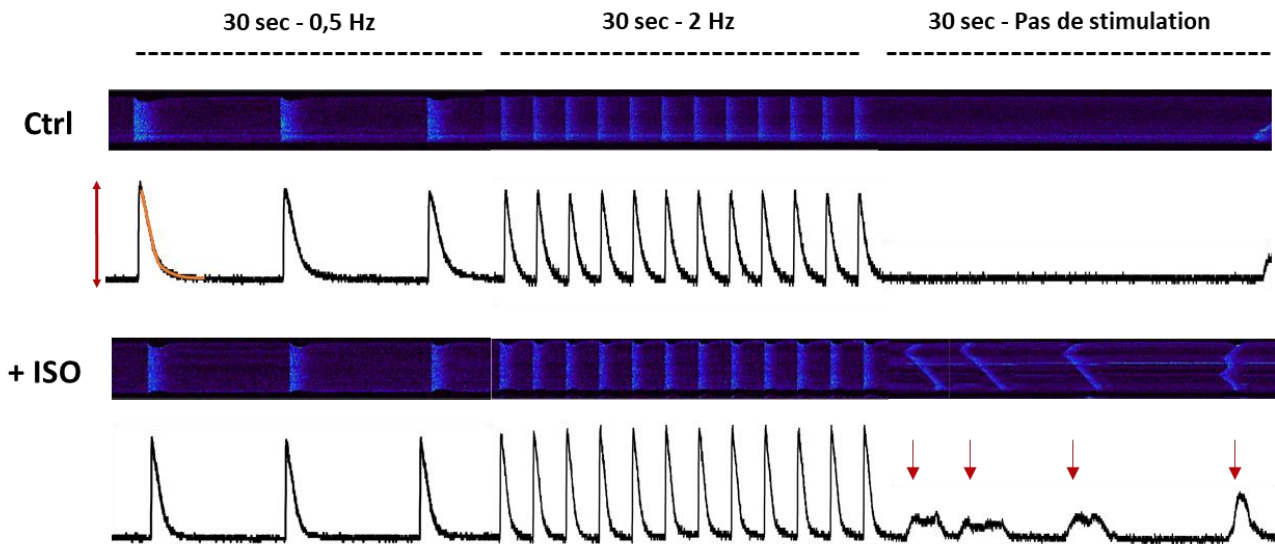


Figure 23 : Enregistrement des transitoires calciques et des vagues calciques spontanées (flèches rouges) sur cardiomyocytes isolés stimulés électriquement (électrodes de champ, Myopacer IONOPTIX). L'analyse des transitoires calciques a consisté à mesurer l'amplitude du transitoire (double flèche rouge) et la cinétique de recapture (trait orange).

### 3. Expérimentations sur mitochondries isolées

Afin d'évaluer l'impact de l'hyperglycémie sur la production d'ERO et l'homéostasie calcique mitochondriale, des expérimentations ont été réalisées sur mitochondries isolées à partir de cœurs perfusés 45 minutes en NG ou HG. Par la suite, le rôle de Drp1 dans ces mécanismes a été évalué sur mitochondries cardiaques isolées à partir de rats NG ou HG, traités ou non avec le Mdivi-1.

#### a. Isolement de mitochondries

Comme décrit précédemment, les mitochondries ont été isolées soit à partir de cœurs isolés perfusés 45 minutes avec une solution NG ou HG ou à partir de cœurs de rat traités ou non à la STZ pendant 48h. Pour cela, les VG ont été broyés à l'aide d'un Ultra Turrax (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik) dans 1.2 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) sur la glace, à 4 °C. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 1 000 g pendant 10 minutes à 4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré puis de nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C afin d'isoler les mitochondries. Le culot, correspondant à la fraction enrichie en mitochondries a ensuite été resuspendu dans 300  $\mu\text{L}$  de

tampon H. Les protéines mitochondriales ont ensuite été dosées avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid, Pierce BCA Protein Assay Kit). Les aliquots de mitochondries sont ensuite conservés dans un bécher placé dans la glace pendant toute la durée des expérimentations.

### **b. Mesure de la production d'EROmt**

Après extraction et dosage des protéines mitochondriales, les mitochondries issues des cœurs perfusés en NG ou HG ont été diluées à 500µg/mL dans un tampon énergisant (tampon E) hypo-osmotique (en mM : 200 Saccharose, 5 Succinate, 10 MOPS, 0,01 EGTA, 1 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 ajusté avec du KOH) puis incubées à 30 °C pendant 15 min avec du MitoSOX Red, une sonde fluorescente sensible à la production d'ERO d'origine mitochondriale (5 µM, excitation : 510 nm ; émission: 580 nm ; Fisher Scientific, Invitrogen). Ensuite, les mitochondries ont été rincées avec du tampon E afin d'éliminer l'excès de sonde fluorescente, puis immédiatement transférées dans une microplaque noire puis dans un lecteur à fluorescence (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX). Les mitochondries ont été stimulées avec du Ca<sup>2+</sup> (5µM) et de l'Antimycine A (100 µM, Sigma-Aldrich A8674), un inhibiteur du complexe III de la CTE, afin de forcer la production d'EROmt et mimer une condition d'IR.

### **c. Mesure de la concentration calcique matricielle**

Les mitochondries issues des cœurs perfusés en NG ou HG ont été isolées puis congelées au -80°C. Le jour de l'expérimentation, les mitochondries ont été remises en suspension dans un tampon d'isolement sans EGTA (en mM : 300 Saccharose, 5 TES, 1 BSA ; pH 7,4). La concentration en protéines mitochondriales a ensuite été déterminée avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid, Pierce BCA Protein Assay Kit). Les mitochondries ont été centrifugées pendant 5 minutes à 16 000g. Le culot, correspondant aux mitochondries a été remis en suspension dans du HCl 0,6N puis homogénéisé et soniqué pendant 5 minutes afin d'induire la rupture des membranes mitochondriales et la libération du contenu matriciel. Suite à la sonication, le surnageant a été récupéré et son pH a été ajusté à 7. La teneur en Ca<sup>2+</sup> du surnageant a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide d'un kit de dosage de l'ocresolphthaléine complexone (Cayman Chemical No. 701220). Les résultats ont été exprimés en nanomoles de Ca<sup>2+</sup> par milligramme de protéines.

#### d. Evaluation de la capacité de rétention calcique (CRC) et de la cinétique d'entrée de $\text{Ca}^{2+}$ dans la mitochondrie

La capacité de rétention calcique (CRC) mitochondriale a été mesurée sur des mitochondries issues de cœurs perfusés en NG ou HG ou sur des mitochondries cardiaques issues de rats traités ou non à la STZ. Le test de CRC permet de mesurer la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  que la mitochondrie peut contenir jusqu'à l'activation irréversible du mPTP. Cette mesure permet d'évaluer la sensibilité de la mitochondrie à un stress calcique tel qu'observé au cours d'une IR. Pour cela, les mitochondries diluées à  $500\mu\text{g}/\text{mL}$  dans du tampon E ont été incubées à  $25^\circ\text{C}$  avec la sonde fluorescente extra-mitochondriale, sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ , le Calcium Green 5N ( $1\mu\text{M}$  ; excitation :  $507\text{ nm}$  ; émission :  $536\text{ nm}$  ; Invitrogen). Ne diffusant pas à travers les membranes, la fluorescence du Calcium Green est dépendante de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le tampon et permet ainsi indirectement de visualiser le captage du  $\text{Ca}^{2+}$  par la mitochondrie. Plus précisément, le protocole consiste à réaliser successivement des pulses de  $\text{Ca}^{2+}$  (3 pulses à  $1\mu\text{M}$  puis des pulses à  $2,5$  ou  $5\mu\text{M}$ ) toutes les 2 minutes dans le milieu contenant les mitochondries. Les mitochondries incorporent alors ce  $\text{Ca}^{2+}$  jusqu'à atteindre une concentration maximale de rétention calcique, à laquelle le mPTP s'active de manière irréversible entraînant ainsi la libération dans le milieu extra-mitochondrial du  $\text{Ca}^{2+}$  incorporé (Figure 24). Le test de CRC est réalisé dans une microplaque noire et la fluorescence de la sonde est mesurée par spectrofluorimétrie (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX). Dans certains puits, les mitochondries ont été traitées avec du Mitotempo ( $1\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich), un inhibiteur des EROmt, ou de la cyclosporine A (Csa ;  $2\mu\text{M}$ , Sigma Aldrich), un inhibiteur de l'ouverture du mPTP pour confirmer la fiabilité du test.

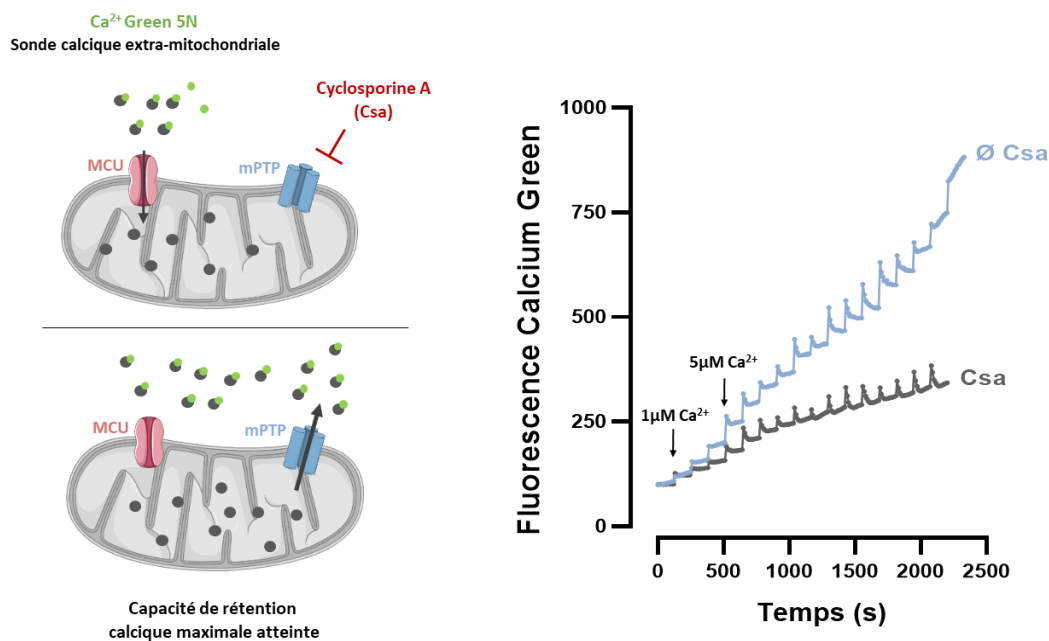


Figure 24 : Evaluation de la capacité de rétention calcique mitochondriale (CRC) sur mitochondries isolées

Pour finir, la cinétique d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries a également été évaluée sur mitochondries isolées incubées avec du Calcium Green-5N mais traitées avec l'inhibiteur du mPTP (Csa,  $2\mu\text{M}$ ) et l'inhibiteur du NCX mitochondrial (CGP-37157,  $10\mu\text{M}$ ) afin de bloquer la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par les mitochondries. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries a été mesurée suite à un pulse unique de  $\text{Ca}^{2+}$  à  $2,5\mu\text{M}$ . La fluorescence du Calcium Green 5N a été mesurée tout au long des expériences dans un lecteur de microplaques (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX) (Figure 25)

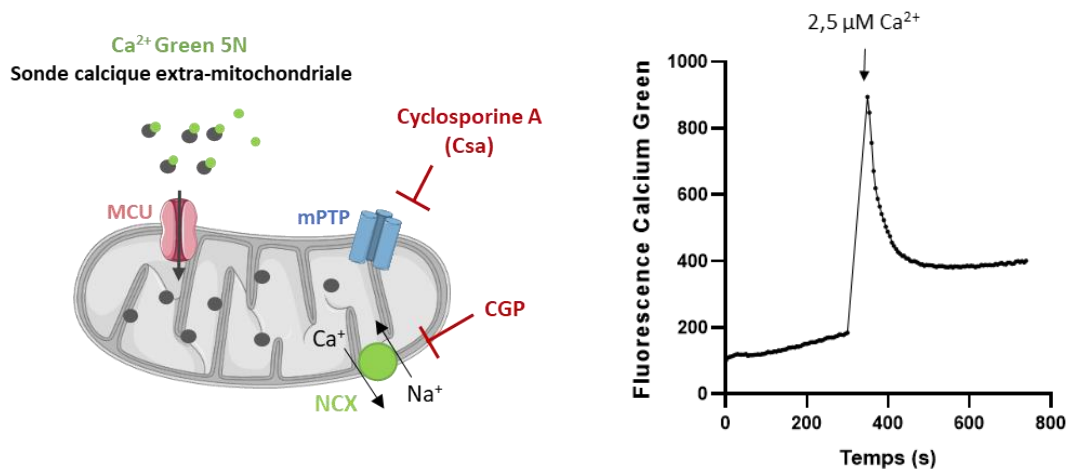


Figure 25 : Evaluation de la cinétique d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie

#### 4. Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM) ou de médiane  $\pm$  l'intervalle interquartile pour les diagrammes en violon. Pour la comparaison de deux groupes expérimentaux, un test t non apparié de Student a été réalisé. Pour la comparaison de 3 groupes ou plus, une analyse de variance (ANOVA) ou une ANOVA en mesures répétées, suivies par le test de comparaisons multiples de Turkey lorsque les données étaient normalement distribuées (confirmé par le test de normalité de Shapiro-Wilk). Si nécessaire, des tests non paramétriques ont été utilisés (test de Mann-Whitney pour deux groupes). Lorsque le risque  $\alpha$  est inférieur à 5% les variables mesurées sont considérées comme statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ). Les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism (8.4.3).



# RÉSULTATS



## Article soumis dans *Redox Biology*

### **Altered mitochondrial calcium homeostasis in hyperglycemia triggers rat heart vulnerability to ischemia-reperfusion: key role of DRP1**

Mathilde Dubois<sup>1</sup>, Doria Boulghobra<sup>1</sup>, Gilles Rochebloine<sup>1</sup>, Florian Pallot<sup>1</sup>, Marc Yehya<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>2</sup>, Sandrine Gayraud<sup>1</sup>, Florence Coste<sup>1</sup>, Guillaume Walther<sup>1</sup>, Gregory Meyer<sup>1</sup>, Jean-Charles Gaillard<sup>3</sup>, Jean Armengaud<sup>3</sup>, Béatrice Alpha-Bazin<sup>3</sup>, Cyril Reboul<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> UR407 INRAE Pathologie Végétale, INRAE, 84140, Montfavet, France.

<sup>3</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France

\*, Corresponding author: Cyril REBOUL

**Email:** [cyril.reboul@univ-avignon.fr](mailto:cyril.reboul@univ-avignon.fr)

**Author Contributions:** Conception, hypothesis definition, and study design: CR, GM, BA-B, JA and MD; data acquisition, analysis, and interpretation: MD, DB, SG, IB, MY, GR, GW, FC, JG, BA-B, and CR; article writing, MD, BA-B, JA and CR.

**Competing Interest Statement:** The authors have no conflict of interest.

**Classification:** Biological Sciences, Physiology

**Keywords:** Mitochondria, calcium homeostasis, hyperglycemia, ischemia-reperfusion

## ABSTRACT

Hyperglycemia increases the heart sensitivity to ischemia-reperfusion (IR), but the underlying cellular mechanisms remain unclear. Mitochondrial dynamics (the processes that govern mitochondrial morphology and their interactions with other organelles, such as the reticulum), has emerged as a key factor in the heart vulnerability to IR. However, it is unknown whether mitochondrial dynamics contributes to hyperglycemia deleterious effect during IR. We hypothesized that (i) the higher heart vulnerability to IR in hyperglycemic conditions could be explained by hyperglycemia effect on the complex interplay between mitochondrial dynamics, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, and reactive oxygen species (ROS) production; and (ii) the activation of DRP1, a key regulator of mitochondrial dynamics, could play a central role. Using transmission electron microscopy and proteomic analysis, we showed that the interactions between sarcoplasmic reticulum and mitochondria and mitochondrial fission were increased during IR in isolated rat hearts perfused with a hyperglycemic buffer compared with hearts perfused with a normoglycemic buffer. In isolated mitochondria and cardiomyocytes, hyperglycemia increased mitochondrial ROS production and Ca<sup>2+</sup> uptake. This was associated with higher RyR2 instability. These results could contribute to explain the early mPTP activation in mitochondria from isolated hearts perfused with a hyperglycemic buffer and in hearts from streptozotocin-treated rats (to increase the blood glucose). DRP1 inhibition by Mdivi-1 before IR induction, normalized Ca<sup>2+</sup> homeostasis, ROS production, mPTP activation, and reduced the heart sensitivity to IR in streptozotocin-treated rats. In conclusion, hyperglycemia-dependent DRP1 activation results in altered mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> homeostasis that contribute to the higher heart vulnerability to IR.

## INTRODUCTION

Acute myocardial infarction is a leading cause of morbidity and mortality worldwide, accounting for 16% of all deaths worldwide (1). Timely reperfusion of the ischemic myocardium is currently the only therapeutic solution to reduce cardiomyocyte death and limit infarct size. However, blood flow restoration results paradoxically in additional and irreversible cardiac damage (i.e. reperfusion injuries). Although the molecular mechanisms proposed to explain this phenomenon are still debated, mitochondria are recognized as key triggers of cell death during acute myocardial infarction. Indeed, in the first few minutes, reperfusion leads to injuries driven by mitochondria due to excessive reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) overload that trigger the opening of the mitochondrial permeability transition pores (mPTP). Long-lasting pore opening results in mitochondrial permeability, matrix swelling, membrane rupture and release of cytochrome C and other pro-apoptotic factors that induce cardiomyocyte death.

In the last decades, the interplay between the mitochondrial network and the sarcoplasmic reticulum (SR) has emerged as a key element in the vicious circle between  $\text{Ca}^{2+}$  overload, ROS overproduction and mPTP activation during ischemia-reperfusion (IR) (2,3). These two organelles are tightly associated through very dynamic connections called mitochondria-associated membranes (MAMs). MAMs are maintained by protein-based tethers, including mitofusins (Mfn). It has been suggested that Mfn2, located on the endoplasmic reticulum (ER) surface, forms dimers with Mfn1 or Mfn2 located on the mitochondrial outer membrane, thus forming a bridging complex between these organelles. MAMs form functional microdomains that have been described as  $\text{Ca}^{2+}$  exchange platforms, notably through the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R)-glucose-regulated protein 75 (GRP75)-voltage-dependent anion channel (VDAC) protein complex which plays a crucial role in the regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and homeostasis (4). However, in excitable cells, such as cardiomyocytes,  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR during excitation-contraction coupling (ECC) mainly depends on ryanodine receptor 2 (RyR2). Recent results showed close apposition between RyR2 clusters and mitochondria (5), RyR2 localization at MAMs (6), and coupling of RyR2 with VDAC2 (7). These findings suggest that in cardiomyocytes, RyR2 could be a key mediator of the crosstalk between SR and mitochondria (8). These results are line with the beat to beat variations of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in cardiomyocytes (9). MAMs are also essential for regulating the equilibrium between mitochondrial fusion and fission. During acute myocardial infarction, excessive mitochondrial fission has been associated with altered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (10), ROS overproduction (11), higher mPTP activation and sensitivity to IR (12). The GTPase dynamin-related protein 1 (DRP1) plays a key role in mitochondrial fission that occurs at contact sites between SR and mitochondria where DRP1 accumulates. DRP1 oligomerization constricts the outer mitochondrial membrane, leading to mitochondrial division (13,14). Besides this canonical role, DRP1 role in cellular homeostasis is more complex. A recent study showed

that DRP1 promotes the ER tubulation around mitochondria independently of its oligomerization, facilitating the contact between these organelles (15). Moreover, DRP1 might promote mPTP activation (16) and apoptotic pathways (17) and might regulate mitophagy (18). In line with these complex roles, the DRP1 inhibitor Mdivi-1 reduces ROS production and cytosolic Ca<sup>2+</sup> overload during IR (10), prevents early mPTP opening (12), and reduces infarct size (12,19). These results strongly support the idea that DRP1 could play a central role in the complex interplay of mitochondrial dynamics, Ca<sup>2+</sup> homeostasis, and ROS production during IR.

In clinical studies, high blood glucose has been associated with poor myocardial infarction prognosis (20). Indeed, in-hospital mortality and myocardial infarct size are positively correlated with blood glucose concentration (21), particularly in patients without diabetes compared with patients with diabetes admitted with similar blood glucose concentrations (22,23). This glucotoxicity has been confirmed in animal and cellular models (24,25). However, the underlying cellular mechanisms are not clear. Recent studies reported that hyperglycemia can alter Ca<sup>2+</sup> homeostasis in isolated cardiomyocytes through exacerbated ROS production and RyR2 instability (26). Moreover, in different cell lines, hyperglycemia has been associated with higher mitochondrial fission (27,28), ROS overproduction, and early mPTP activation (28,29). DRP1 activation seems to play a key role. Indeed, in H9C2 cardiomyoblasts that express a dominant-negative DRP1 mutant (DRP1-K38A), mitochondrial fission in response to hyperglycemia is normalized, with a positive effect on ROS production and cells death (29). To date, it is not known whether DRP1 activation in response to hyperglycemia influences the complex interplay between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis, ROS production, and cell death during IR.

Here, we determined whether i) hyperglycemia deleterious effect on the complex interplay of mitochondrial dynamics, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and ROS production contributed to the higher heart vulnerability to IR in hyperglycemic conditions, and ii) DRP1 activation in hyperglycemic conditions could play a central role. Using an integrative approach based on *in vivo* and *ex vivo* experiments in rats, electronic and confocal microscopy, proteomic and biochemical assays, we found that in hyperglycemic conditions, IR was associated with higher mitochondrial ROS production and mitochondrial fission and also increased interactions between SR and mitochondria. These changes could contribute to explain the mitochondrial and cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis alterations. We also found that DRP1 activation in hyperglycemic conditions plays a key role in these alterations and in the higher heart vulnerability to IR.

## RESULTS

### Hyperglycemia-induced mitochondrial ROS production triggers early mPTP activation.

Hyperglycemia is associated with higher heart vulnerability to IR (25,30) that might be partly triggered by ROS overproduction (24). However, besides oxidative stress, the underlying mechanisms have been poorly studied. Therefore, we first investigated hyperglycemia effect on isolated rat hearts, stabilized in normoglycemic (NG) buffer (11mM D-glucose) for 30min, and then perfused with 11mM D-glucose (NG hearts) or with 33mM D-glucose (hyperglycemic, HG, hearts) for 45min (SI Appendix Fig. S1A). Hyperglycemia did not affect the left ventricle (LV) contractile function, evaluated by recording the LV developed pressure (devP) throughout the perfusion period (SI Appendix Fig. S1B). At the perfusion end, we evaluated ROS production by staining the LV tissue with the ROS-sensitive dihydroethidium (DHE) dye (10 $\mu$ M). As previously shown (26,31), DHE fluorescence intensity was increased by 35% in HG hearts compared with NG hearts, indicating higher ROS production (SI Appendix Fig. S1C). Perfusion of mannitol, used as osmotic control, did not have any effect (SI Appendix Fig. S1C). Next, we evaluated hyperglycemia effect on the heart functional recovery following IR. For this, NG and HG hearts were subjected to 25min of global ischemia followed by 10min of reperfusion in NG or HG buffer (Fig. 1A). In line with previous studies (30), LV devP recovery was reduced by 51% in HG hearts compared with NG hearts (Fig. 1B). This lower functional recovery was associated with higher ROS production measured by DHE staining (+24%) compared with NG hearts (Fig. 1C). We then evaluated whether hyperglycemia could affect ROS production, measured with the ROS-sensitive dihydrorhodamine 123 dye (DHR123; 5 $\mu$ M), in freshly isolated cardiomyocytes (Fig. 1D). After incubation in NG (6mM) or HG (33mM) solution for 45min, we stimulated cardiomyocytes with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 100 $\mu$ M) to mimic IR-induced oxidative stress. Before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, DHR123 fluorescence intensity was comparable between NG and HG cardiomyocytes. After incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DHR123 fluorescence intensity increased in both groups, but significantly more in HG cardiomyocytes (Fig. 1D), confirming higher ROS production in HG cardiomyocytes in stress conditions. Conversely, DHR123 fluorescence intensity increase in cardiomyocytes incubated with L-glucose (osmotic control) was similar to what observed in NG cardiomyocytes (SI Appendix Fig. S2A). Recently, ROS overproduction by cardiomyocytes in hyperglycemic conditions has been attributed to NOX2 (26). Therefore, we asked whether GSK-2795039 (25 $\mu$ M), a NOX2-specific inhibitor, could blunt hyperglycemia deleterious effect in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stressed cells. NOX2 inhibition markedly reduced ROS production in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NG and HG cardiomyocytes (SI Appendix Fig. S2B), although ROS production remained significantly higher in HG cardiomyocytes. These results suggest that in conditions mimicking IR, another ROS source contributes to hyperglycemia deleterious effect. Therefore, we used mitochondria isolated from HG and NG hearts (45min perfusion), loaded with the ROS-sensitive dye MitoSOX-Red and stimulated with antimycin-A (AA; 10 $\mu$ M) to force ROS

production through complex III inhibition and mimic IR (Fig. 1E). MitoSOX-Red fluorescence intensity increase was higher in mitochondria isolated from HG hearts than NG hearts (Fig. 1E). Then, we determined whether hyperglycemia affected the activation of mPTP, a key trigger of heart sensitivity to IR. For this, we performed calcium retention capacity (CRC) tests, using the extra-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N ( $1\mu\text{M}$ ) and mitochondria isolated from rats treated or not with a single dose of streptozotocin (STZ, 40 mg/kg), a drug that induces the necrosis of pancreatic  $\beta$  cells and the subsequent increase in blood glucose level. In this model, to avoid confounding factors linked to type1 diabetes, we performed the experiments 48h after STZ injection in rats with a blood glucose level of  $594 \pm 25.9$  mg/dl (SI Appendix Fig. S3A). We first confirmed with cyclosporine A (CsA;  $2\mu\text{M}$ ), a potent mPTP inhibitor (32), that our test was designed to evaluate mPTP activation. CsA limited the progressive increase in  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N fluorescence intensity in response to cumulative  $\text{Ca}^{2+}$  pulses (SI Appendix Fig. S3B). Moreover, the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N fluorescence in response to successive  $\text{Ca}^{2+}$  pulses was higher in heart mitochondria from STZ-treated rats (HG) than untreated rats (NG) (Fig. 1F), suggesting lower mitochondrial CRC in hyperglycemia. To evaluate the implication of mitochondrial ROS (mtROS) production, we used mitochondria isolated from HG and NG hearts (45min perfusion) in the presence or not of MitoTEMPO (MitoT;  $1\mu\text{M}$ ), an antioxidant targeting the mitochondria. First, we confirmed that CRC was reduced in mitochondria from HG hearts compared with mitochondria from NG hearts, suggesting an early mPTP activation (Fig. 1G). Mitochondria from hearts perfused with mannitol buffer (osmotic control) did not show any change compared with those from NG hearts (SI Appendix Fig. S3C). Then, we showed that incubation of hearts with MitoT during perfusion with HG/NG buffer improved significantly the CRC in mitochondria from HG hearts and to a lesser extent from NG hearts (SI Appendix Fig. S3D). Similarly, pre-treatment of isolated mitochondria with MitoT before the CRC test completely abolished the difference between mitochondria isolated from NG and HG hearts (Fig. 1G). Altogether, these results strongly support the idea that hyperglycemia affects mtROS production with potential deleterious effects on mitochondrial calcium homeostasis and mPTP activation.

### **Hyperglycemia during IR exacerbates mitochondrial fission and promotes interactions between mitochondria and sarcoplasmic reticulum**

As alterations of mitochondrial dynamics during acute myocardial infarction trigger mtROS production and early mPTP opening (11,12), we next investigated hyperglycemia effect on mitochondrial shape following IR. For this, we performed ex vivo IR on isolated hearts in NG or HG conditions and prepared tissues for transmission electron microscopy (Fig. 2A). We evaluated mitochondrial shape after 10min of reperfusion by measuring the mitochondrial area and the aspect ratio that reflects the length to width ratio and is more independent of mitochondrial swelling. The

mitochondrial aspect ratio and area (Fig. 2B-D) were significantly decreased in hearts that underwent IR in HG condition compared with the NG condition. This suggested that hyperglycemia during IR leads to excessive mitochondrial fission. We next investigated signaling pathways involved in the mitochondrial dynamics regulation. As mitochondrial fission requires DRP1 activation and translocation from the cytosol to mitochondria, we measured by western blotting the total DRP1 level in the cytosolic and mitochondrial fractions obtained from hearts undergoing IR in NG or HG condition (Fig. 2E-F). Hyperglycemia during IR significantly increased the mitochondrial/cytosolic DRP1 ratio (Fig. 2G), suggesting that DRP1 translocation to mitochondria was higher following IR in HG hearts. Moreover, DRP1 phosphorylation on S616 (activation site) was increased in the mitochondrial subfraction (Fig. 2F-H), without any effect on DRP1 phosphorylation on S637 (inhibitory site) (SI Appendix Fig. S4A).

Interactions between SR/ER and mitochondria are required for mitochondrial dynamics regulation (13,33), and DRP1 might act as a key trigger of such interactions (15). Thus, we investigated whether HG-mediated mitochondrial fission during IR was associated with increased interactions. Using transmission electron microscopy, we measured the SR-mitochondria distance and the surface of this interaction (Fig. 2I-K). Our results highlighted more contact points between mitochondria and SR in the HG conditions. To confirm this, we performed a shotgun proteomic analysis using mitochondrial subfractions from NG and HG hearts undergoing *ex vivo* IR. Among the proteins that were more abundant in the mitochondrial subfraction of HG hearts, some proteins were SR-specific and involved in the regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis (RyR2, PLN) or in SR tubulation (Reep5Dp1) (34,35) (Fig. 2L), reinforcing the idea that following IR in HG condition, interactions between SR and mitochondria were promoted. We also found that OST48, a reticulum protein involved in protein N-glycosylation, was more abundant in the mitochondrial subfraction of HG hearts. Interestingly, N-glycosylation is implicated in the regulation of ER morphology and dynamics (36). Altogether, these results strongly support the idea that IR in HG conditions triggers the activation of the DRP1 pathway, which is associated with higher mitochondrial fission and SR-mitochondrial interactions.

### **Hyperglycemia alters mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis**

Mitochondria and SR interactions trigger Ca<sup>2+</sup> transfer from the SR to the mitochondria. This transfer plays a key role in cardiac myocyte excitation-bioenergetic coupling, but can also lead to mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and subsequent mtROS and mPTP activation (37). Thus, we determined whether hyperglycemia increases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. First, we measured the level of matrix Ca<sup>2+</sup> in mitochondria isolated from NG and HG hearts (45min perfusion). The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> content was higher in HG than NG mitochondria without reaching statistical significance (Fig. 3A). As Ca<sup>2+</sup> entry in mitochondria is regulated mainly by the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter (MCU) complex



(38,39), we assessed  $\text{Ca}^{2+}$  uptake through this complex in mitochondria isolated from NG and HG hearts using the  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N probe (Fig. 3B). To avoid confounding factors due  $\text{Ca}^{2+}$  release by mitochondria through the mitochondrial  $\text{Na}^{+}/\text{Li}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCLX) or mPTP, we performed the experiments in the presence of CGP37157 (10 $\mu\text{M}$ ) and CsA (1mM) to inhibit these channels, respectively. The rate of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria following a single 2.5 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  pulse was higher in mitochondria isolated from HG than NG hearts (Fig. 3B). Similarly,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake rate was higher in mitochondria isolated from hearts of STZ-treated (HG) than untreated rats (NG) (Fig. 3C). In cardiomyocytes,  $\text{Ca}^{2+}$  exchange between SR and mitochondria is mediated through  $\text{Ca}^{2+}$  release by IP3R or through  $\text{Ca}^{2+}$  release during the ECC by RyR2. We next measured mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in isolated cardiomyocytes loaded with Rhod-2, a mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive probe. After incubation in NG or HG buffer for 45min, we incubated cardiomyocytes with histamine (500 $\mu\text{M}$ ) and isoproterenol (ISO, 1 $\mu\text{M}$ ) to stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR through IP3R and RyR2, respectively. Rhod-2 fluorescence intensity was comparable in NG and HG cardiomyocytes after IP3R stimulation by histamine (Fig. 3D), whereas it was significantly higher in HG cardiomyocytes following incubation with ISO (Fig. 3E). This suggests a key role of RyR2 in the increased mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by HG cardiomyocytes. Next, we evaluated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in electrically paced cardiomyocytes to stimulate ECC and  $\text{Ca}^{2+}$  release by RyR2. After 45min incubation in NG or HG buffer, we paced cardiomyocytes with field electrodes (MyoPacer, Ionoptix System) (30s at 0.5Hz followed by 30s at 4Hz) to stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in mitochondria. We recorded line scan (x-t) confocal images of Rhod2 fluorescence to evaluate changes in mitochondrial diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  level (Fig. 3F). First, we confirmed using Ruthenium 360 (Ru360), a potent MCU inhibitor, that Rhod2 fluorescence changes were related to  $\text{Ca}^{2+}$  entry in mitochondria through the MCU (Fig. 3F). Then, we confirmed that mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was higher in HG than NG cardiomyocytes (Fig. 3F). Indeed, despite no difference between NG and HG cardiomyocytes during the stimulation at 0.5Hz, Rhod2 fluorescence intensity (F/F0) was increased by 155% in HG cardiomyocytes and by 90% in NG cardiomyocytes at 4Hz. Perfusion with mannitol gave similar results as with the NG buffer (SI Appendix Fig. S5A). These results strongly suggest that hyperglycemia increases  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria in response to stress (i.e. incubation with ISO or high pacing).

### **Hyperglycemia alters cardiomyocyte calcium homeostasis in response to stress**

During IR, alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  handling leading to cytosolic and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload play a key role in IR injuries (40). As the ischemic- and reperfusion-induced rigor-type LV contracture can be used as cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  overload index (41), we analyzed hyperglycemia effect on ischemic and early-reperfusion-induced LV contracture. In isolated hearts undergoing ex vivo IR, the amplitude (Fig. 4A) and increase of LV contracture after 10min of reperfusion (Fig. 4B) were higher in HG than NG



hearts. This suggests higher Ca<sup>2+</sup> overload in HG than NG hearts. Among the factors that may explain the altered calcium homeostasis, recent studies reported that hyperglycemia promotes RyR2 instability and subsequent arrhythmogenic SR Ca<sup>2+</sup> leak (26,42). As we showed a key role of Ca<sup>2+</sup> release through the RyR2 in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> increase, we investigated hyperglycemia effect on Ca<sup>2+</sup> handling in isolated cardiomyocytes incubated with HG or NG buffer and loaded with the cytosolic Ca<sup>2+</sup> sensitive dye Fluo-4 (10 $\mu$ M). We recorded line scan (x-t) confocal images of Fluo-4 fluorescence to evaluate changes in cytosolic Ca<sup>2+</sup> level (Fig. 4C,F). In basal conditions (i.e. 0.5Hz), we did not observe any difference between cardiomyocytes in the Ca<sup>2+</sup> transient amplitude and the exponential decay time constants (Tau) of calcium transients (Fig. 4D-E). After stimulation with ISO (1 $\mu$ M), the Ca<sup>2+</sup> transient amplitude tended to increase similarly in NG-, HG- (Fig. 4D) and mannitol-incubated cardiomyocytes (SI Appendix Fig. S6A). ISO stimulation significantly and similarly decreased Tau in NG-, HG- (Fig. 4E) and mannitol-incubated cardiomyocytes (SI Appendix Fig. S6B). As increasing Ca<sup>2+</sup> leak through the RyR2 could result in spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves (43), we evaluated the effect of high pacing (2Hz, 30s), in the presence/absence of ISO, on spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves (SCaW) (Fig. 4F-G). Following electrical field pacing (30s at 0.5Hz followed by 30s at 2Hz), we measured SCaW number over 30s without stimulation. SCaW number was higher in HG than NG cardiomyocytes (Fig. 4G). Following stimulation with ISO, SCaW number increased both in NG and HG cardiomyocytes, but remained higher in HG than NG (Fig. 4G) and mannitol-incubated cardiomyocytes (SI Appendix Fig. S6C). As hyperglycemia was associated with higher mtROS in stress situations and mtROS triggers Ca<sup>2+</sup> leak through RyR2 (44), we determined whether MitoT (1 $\mu$ M) influenced SCaW occurrence. In basal conditions (i.e. without ISO), MitoT did not affect SCaW occurrence in cardiomyocytes, although SCaW number was slightly increased in NG cardiomyocytes (Fig. 4G). Following incubation with ISO, MitoT had no effect on SCaW number in NG cardiomyocytes, but normalized SCaW number in HG cardiomyocytes (Fig. 4G), suggesting a key role of mtROS in RyR2 instability in hyperglycemia. These results strongly support the idea that hyperglycemia is associated with altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis in response to stress, with a key role for the exacerbated mtROS production.

### **Hyperglycemia-induced DRP1 activation triggers mitochondrial ROS overproduction, altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis, early mPTP activation, and heart sensitivity to IR**

Here, we showed that hyperglycemia is associated with increased mitochondrial fission and interactions between RS and mitochondria interactions during IR. DRP1 activation could be implicated in the complex interplay between mtROS and altered calcium homeostasis. Therefore, we investigated whether DRP1 inhibition with Mdivi-1 (50 $\mu$ M) prevented hyperglycemia deleterious impact. In isolated cardiomyocytes perfused with HG, Mdivi-1 normalized ROS production following H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress to the level observed in NG cardiomyocytes, but did not have any effect in NG cardiomyocytes (Fig. 5A). We

next investigated Mdivi-1 effect on cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (Fig. 5B). In basal conditions (i.e. 0.5Hz without ISO), Mdivi-1 had no effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude (Fig. 5C), on Tau (Fig. 5D), and on SCaW number (in line with the results obtained with MitoT) in NG and HG cardiomyocytes (Fig. 5E). Following stimulation with ISO, Mdivi-1 did not influence  $\text{Ca}^{2+}$  transient amplitude and Tau (Fig. 5C-D). Conversely, it normalized SCaW number in HG cardiomyocytes to the level observed in NG cardiomyocytes on which it did not have any effect (Fig. 5E). Therefore, we next determined whether Mdivi-1 could modulate mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in STZ-treated rats. Untreated (NG) and STZ-treated (HG) rats received an intraperitoneal injection of Mdivi-1 (1.2 mg/kg) 24h and 1h before the experiments. Then, we isolated cardiac mitochondria, as previously described, and measured  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in the presence of both CGP37157 and CsA to inhibit  $\text{Ca}^{2+}$  release by NCLX and mPTP, respectively. Mdivi-1 had no effect on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria from control hearts (NG) (Fig. 5F). Conversely, DRP1 inhibition reduced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in mitochondria from the heart of STZ-treated rats (HG) (Fig. 5G). Then, we assessed Mdivi-1 effect on mitochondrial CRC in the same animal model. Unexpectedly, Calcium Green-5N fluorescence intensity strongly increased in response to calcium pulses in mitochondria from NG rats treated with Mdivi-1 compared with untreated NG animals (Fig. 5H). This suggests a lower mitochondrial CRC when DRP1 is inhibited in NG hearts before mitochondrial isolation. However, in mitochondria from STZ-treated rats treated with Mdivi-1, the increase in Calcium Green-5N intensity in response to calcium pulses was significantly reduced (Fig. 5H), suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  release was lower and mPTP activation delayed.

As these results suggest a key role of DRP1 in hyperglycemia deleterious effect on the complex interplay between mtROS and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, we next assessed the effect of DRP1 inhibition in STZ-treated and untreated rats following injection of Mdivi-1 at 24h and 1h before in vivo IR. The procedure was designed to modulate the effect of DRP1 activation during hyperglycemia with only a moderate effect on its activation in response to IR (Fig. 6A). Before using Mdivi-1, we confirmed that 48h after a single injection of STZ, blood glucose level was increased compared with vehicle (Fig. 6B). Then, we showed that survival rate during IR was reduced in STZ-treated rats (HG), compared with untreated rats (NG) (Fig. 6C). We next compared the ECG profiles throughout IR in the animals that survived during IR. We used the corrected QT interval (QTc) as an index of heart sensitivity to IR. Before ischemia (baseline), we did not observe any QTc difference between groups (Fig. 6D). Following 90min of reperfusion, the QTc was increased by 10% in HG animals and only by 3% in NG rats (Fig. 6D). We confirmed that HG animals were more sensitive to IR by measuring the infarct size by triphenyl tetrazolium chloride staining after 2h of reperfusion (Figure 6E-G). These results confirmed (24,25) that hyperglycemia leads to higher IR injuries. Then, we investigated the effect of Mdivi-1 pre-treatment (24h and 1h before IR). Mdivi-1 markedly increased the survival during IR in both NG (by 25%) and HG rats (by 88%). Unexpectedly, Mdivi-1 pre-treatment did not have any protective effect on QTc and

myocardial infarct size in NG rats (Fig. 6D,G). Conversely, in HG animals, in line with the results obtained on isolated cardiomyocytes and mitochondria, Mdivi-1 decreased the QTc to the level observed in NG rats (Fig. 6D) and markedly reduced infarct size (Fig. 6G). These results confirmed that hyperglycemia-induced DRP1 activation plays a central role in hyperglycemia deleterious effects on heart sensitivity to IR.

## DISCUSSION

Our results support the hypothesis that hyperglycemia-induced DRP1 activation plays a key role in the higher heart sensitivity to IR. Specifically, we found that hyperglycemia (i) increased mtROS production and fragmentation as well as interactions between SR and mitochondria during IR. This could (ii) contribute to alter the complex interplay of mitochondrial dynamics, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and ROS production, and (iii) subsequently increase heart sensitivity to IR. Lastly, (iv) the use of Mdivi-1 to inhibit DRP1 allowed normalizing Ca<sup>2+</sup> homeostasis, ROS production and reducing heart sensitivity to IR in the hyperglycemic condition. Collectively, these results provide additional insights to better understand the mechanisms involved in hyperglycemia deleterious effect on heart sensitivity to IR.

The effect of hyperglycemia, associated with diabetic cardiomyopathy, on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis remains controversial. Recently, it has been reported that in mouse models of type 2 diabetes (high fat diet), reduced Ca<sup>2+</sup> transfer from the SR to mitochondria constitutes a key feature of diabetic cardiomyopathy (45). Similarly, in a mouse model of type1 diabetic cardiomyopathy (8 weeks after STZ treatment), the restoration of MCU expression improves mitochondrial Ca<sup>2+</sup> handling and reduces the heart sensitivity to IR (46). However, in another mouse model of type 1 diabetes (single injection of a low dose of STZ) and in diabetic Akita mice, hyperglycemia was associated with higher interactions between SR and mitochondria and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload (47). These results have been confirmed in other mouse models of diabetes, based on high fat diet and intraperitoneal injection of STZ (48), and are in line with our results showing that hyperglycemia increased interactions between SR and mitochondria. These data suggest that in function of the animal model and diabetes duration, the complex interactions between SR/ER and mitochondria could be differently affected. In our model of acute hyperglycemia, which allows avoiding other confounding factors associated with diabetes, we showed that DRP1 activation in response to altered glucose homeostasis could contribute to explain mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis disorders and mtROS production. It is interesting to note that hyperglycemia, with (49) and without diabetes (29), is associated with DRP1 activation and that its inhibition reduces IR heart injuries in diabetic animal models (50).

DRP1 is a key trigger of mitochondrial fission. Its activation is strongly dependent on its phosphorylation on S616 (activation site), whereas phosphorylation on S637 is inhibitory. Among the kinases that positively regulates DRP1 activity through phosphorylation on S616, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is activated in response to ROS (51) and Ca<sup>2+</sup> (52). This could also be true in response to hyperglycemia due to the activation of CaMKII by O-GlcNAcylation (42). High level of cytosolic Ca<sup>2+</sup>, in response to hyperglycemia, also can activate the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) that phosphorylates DRP1 on S616 (53), while the Ca<sup>2+</sup>-dependent protein phosphatase calcineurin dephosphorylates DRP1 on S637 (10,54). Both increase DRP1 activation and mitochondrial fission. Moreover, previous studies showed that the stimulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake with thapsigargin or KCl triggers the reversible fragmentation of the mitochondrial network (55) and that inhibition of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during IR with Ru360 limits mitochondrial fragmentation (56). These results strongly support the idea that hyperglycemia-induced ROS production and altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis trigger DRP1 activation and excessive mitochondrial fission during IR. However, as in our work DRP1 inhibition also normalized ROS production and Ca<sup>2+</sup> homeostasis, we could hypothesize that a more complex bidirectional interplay between these factors contributes to explain hyperglycemia deleterious impact. Indeed, changes in mitochondrial dynamics also can alter mitochondrial and cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Mfn2 knockdown in C2C12 myoblasts to force mitochondrial fission results in reduced mitochondrial Ca<sup>2+</sup> retention capacity (57). However, in this model, mitochondrial fission is associated with lower mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake, unlike in our conditions. Therefore, more studies are needed to precisely describe the complex interplay between mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> homeostasis. DRP1 activation and exacerbated mitochondrial fission trigger mtROS overproduction (61). Similarly, in H9C2 cells, increased ROS production in hyperglycemic conditions requires DRP1-dependent mitochondrial fragmentation (29). Altogether, these results are in line with the scientific literature showing complex interplays between mitochondrial dynamics and changes in Ca<sup>2+</sup> and ROS homeostasis. It is now important to determine whether mitochondrial fission is a key trigger of altered mitochondrial function or a consequence of altered mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS homeostasis.

Our results could also be linked to the non-canonical roles of DRP1. Indeed, besides its role in mitochondrial fission, DRP1 also facilitates interactions between mitochondria and SR/ER (15), promotes mPTP activation (16), apoptotic pathways (17) and regulates mitophagy (18). A recent study suggested a potential role of DRP1 in interactions between mitochondria and ER by showing that DRP1 can shape the ER into tubules independently of GTP hydrolysis, facilitating contacts between organelles (15). Moreover, in cardiomyocytes, DRP1 is observed in MAMs where it colocalizes with RyR2 (18), which are induced in response to metabolic stress caused by high fat diet. Here, we found in response to hyperglycemia, more interactions between SR and mitochondria and higher expression of proteins

involved in the regulation of SR/ER tubulation (Reep5Dp1 and OST48). These results suggest that hyperglycemia stimulates SR remodeling during IR, promoting interactions with mitochondria. We could hypothesize that in response to hyperglycemia, DRP1 contributes to promote SR tubulation around mitochondria, thus increasing MAM number and surface and the subsequent mitochondrial division. This hypothesis is supported by the higher  $\text{Ca}^{2+}$  exchange between SR and mitochondria. Indeed, MAMs are  $\text{Ca}^{2+}$  exchange platforms that play a crucial role in the regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. MAMs also contribute to ROS exchange (58). In our conditions, RyR2 appears as a good candidate to explain higher  $\text{Ca}^{2+}$  exchange from SR to mitochondria and mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload. Indeed, RyR2, which is involved in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transients during ECC, was more abundant in the mitochondrial subfractions obtained from HG hearts undergoing IR. Moreover, although the stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  release from SR by IP3Rs had no effect on mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, we found that both ISO and high pacing, known to stimulate the release of  $\text{Ca}^{2+}$  through RyR2, resulted in higher mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in HG than NG cardiomyocytes. It has been suggested that RyR2 instability plays a key role in the increased  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria. For instance, higher level of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks, a sign of RyR2 diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  leak, has been observed in cardiomyocytes isolated from STZ-treated animals, and their levels was further increased following high glucose treatment (59) and in cardiomyocytes studied in hyperglycemic conditions (26). Here, we confirmed that hyperglycemia increases RyR2 instability that was exacerbated by stimulation with ISO. In conditions of exacerbated ROS production, RyR2 oxidation has been associated with higher RyR2  $\text{Ca}^{2+}$  leak (44). In line, we showed that incubation with MitoT, to target mtROS production, can normalize S $\text{CaW}$  number, used as an index of RyR2 instability. These results are in agreement with previous studies showing that in isolated cardiomyocytes, mtROS scavenging with MitoT reduces caffeine-mediated SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak and that  $\text{Ca}^{2+}$  leak through the RyR2 leads to mtROS production and RyR2 oxidation (44), supporting a bidirectional crosstalk between SR and mitochondria. Such close contacts between mitochondria and SR could constitute an adaptive process to ensure the heart bioenergetic metabolic response (60) where RyR2 can play a key role (61). However, in some conditions, including IR, this promotes mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and mPTP activation (62). In agreement, disrupting the interactions between SR/ER and mitochondria during hypoxia-reoxygenation attenuates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and protects cardiomyocytes (63). To the best of our knowledge, our study is the first to propose that DRP1 activation in response to hyperglycemia could exacerbate this crosstalk. Future studies should investigate the effect of DRP1 activation on the functional and structural interactions between SR and mitochondria.

Overall, our findings strongly suggest that hyperglycemia increases the interactions between SR and mitochondria and that this could trigger a complex interplay between altered mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and mtROS production. This seems to play an important role in the early mPTP activation and in the higher heart sensitivity to IR in hyperglycemic conditions (Fig. 7). These results provide

additional insights to better understand hyperglycemia deleterious impact on IR injuries and highlight DRP1 activation as a potential key target. More studies are needed to better understand how hyperglycemia can stimulate both the canonical and non-canonical DRP1 pathways to increase the heart sensitivity to IR.

## **MATERIALS AND METHODS**

Materials and methods are described in details in the SI Appendix, SI Materials and Methods.

All animal experiments were performed following protocols approved by the French national ethics committee for animal care (N° CEEA-32041 and CEEA-27001) and adhere to the guidelines of the European Parliament Directive 2010/63/EU.

### **Animal models**

For *in vivo* experiments, male Wistar rats (12-week-old; weight=250-275 g, Janvier, France) were randomly distributed in two groups: normoglycemic group (NG) that received an injection of vehicle (citrate buffer) and hyperglycemic group (HG) that received a single injection of STZ (40mg/kg, Sigma Aldrich S0130) intraperitoneally. Two days after STZ injection, blood glucose levels were measured to confirm the hyperglycemic state.

### **In vivo ischemia-reperfusion**

*In vivo* IR was performed as previously described (64). Briefly, after anesthesia, rats received an injection of buprenorphine subcutaneously (0,1mg/kg) and then, they were endotracheally intubated and mechanically ventilated. A thoracotomy was performed to expose the left anterior descending coronary artery that was ligated with a 5-0 silk suture for 30min, followed by 120min of reperfusion. The ECG signal was recorded with electrodes placed on the skin surface. After reperfusion, myocardial infarct size was determined by triphenyl tetrazolium staining (0.1%).

### **Data and Materials availability.**

All mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifiers PXD044927 and 10.6019/PXD044927. [Reviewers can access this private dataset using reviewer\_pxd044927@ebi.ac.uk as Username, and xd6SX9EG as Password]. Full data are available from the corresponding authors upon reasonable request.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Christine Bothuan for technical assistance at the animal facility.

**FUNDING**

This work was supported by a PhD grant to M.D. from Avignon University. This work was supported by an excellence research grand from Avignon University.



## REFERENCES

1. WHO Global Health Estimates. The top 10 causes of death [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Ruiz-Meana M, Fernandez-Sanz C, Garcia-Dorado D. The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2010 Oct 1;88(1):30–9.
3. Lopez-Crisosto C, Pennanen C, Vasquez-Trincado C, Morales PE, Bravo-Sagua R, Quest AFG, et al. Sarcoplasmic reticulum–mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nat Rev Cardiol*. 2017 Jun;14(6):342–60.
4. Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal*. 2011 Dec;9(1):19.
5. Sharma VK, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, Sheu SS. Transport of Ca<sup>2+</sup> from Sarcoplasmic Reticulum to Mitochondria in Rat Ventricular Myocytes.
6. Chen Y, Csordás G, Jowdy C, Schneider TG, Csordás N, Wang W, et al. Mitofusin 2-Containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses Via Interorganelle Ca<sup>2+</sup> Crosstalk. *Circ Res*. 2012 Sep 14;111(7):863–75.
7. Min CK, Yeom DR, Lee KE, Kwon HK, Kang M, Kim YS, et al. Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca<sup>2+</sup> transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochem J*. 2012 Nov 1;447(3):371–9.
8. Eisner V, Csordás G, Hajnóczky G. 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*. 2013 Jan 1;jcs.093609.
9. Maack C, O'Rourke B. Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol*. 2007 Sep;102(5):369–92.
10. Sharp WW, Fang YH, Han M, Zhang HJ, Hong Z, Banathy A, et al. Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission. *FASEB J*. 2014;28(1):316–26.
11. Disatnik M, Ferreira JCB, Campos JC, Gomes KS, Dourado PMM, Qi X, et al. Acute Inhibition of Excessive Mitochondrial Fission After Myocardial Infarction Prevents Long-term Cardiac Dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(5):e000461.
12. Ong SB, Subrayan S, Lim SY, Yellon DM, Davidson SM, Hausenloy DJ. Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):2012–22.
13. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*. 2011 Oct 21;334(6054):358–62.
14. Fernandez-Sanz C, De La Fuente S, Nichtova Z, Yuan Y, Lanvermann S, Tsai HY, et al. ACTIN Anchors the Highly Oligomeric DRP1 at Mitochondria-Sarcoplasmic Reticulum Contact Sites in Adult Murine Heart: Its Functional Implication [Internet]. *Physiology*; 2021 Dec [cited 2023 May 18]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.11.29.470468>



15. Adachi Y, Kato T, Yamada T, Murata D, Arai K, Stahelin RV, et al. Drp1 Tubulates the ER in a GTPase-Independent Manner. *Mol Cell*. 2020 Nov;80(4):621-632.e6.
16. Zhang H, Wang P, Bisetto S, Yoon Y, Chen Q, Sheu SS, et al. A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovasc Res*. 2017 Feb;113(2):160–70.
17. Jenner A, Peña-Blanco A, Salvador-Gallego R, Ugarte-Urbe B, Zollo C, Ganief T, et al. DRP1 interacts directly with BAX to induce its activation and apoptosis. *EMBO J*. 2022 Apr 19;41(8):e108587.
18. Tong M, Mukai R, Mareedu S, Zhai P, Oka S ichi, Huang CY, et al. Distinct Roles of DRP1 in Conventional and Alternative Mitophagy in Obesity Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2023 Jun 23;133(1):6–21.
19. Ishikita A, Matoba T, Ikeda G, Koga J, Mao Y, Nakano K, et al. Nanoparticle-Mediated Delivery of Mitochondrial Division Inhibitor 1 to the Myocardium Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondria Outer Membrane Permeabilization: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016 Jul 6;5(7):e003872.
20. Penna C, Andreadou I, Aragno M, Beauloye C, Bertrand L, Lazou A, et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *Br J Pharmacol*. 2020 Dec;177(23):5312–35.
21. Mather AN, Crean A, Abidin N, Worthy G, Ball SG, Plein S, et al. Relationship of dysglycemia to acute myocardial infarct size and cardiovascular outcome as determined by cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2010 Dec;12(1):61.
22. Kosiborod M, Rathore SS, Inzucchi SE, Masoudi FA, Wang Y, Havranek EP, et al. Admission Glucose and Mortality in Elderly Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: Implications for Patients With and Without Recognized Diabetes. *Circulation*. 2005 Jun 14;111(23):3078–86.
23. Eitel I, Hintze S, Waha S de, Fuernau G, Lurz P, Desch S, et al. Prognostic Impact of Hyperglycemia in Nondiabetic and Diabetic Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: Insights From Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2012 Nov;5(6):708–18.
24. Yang Z, Laubach VE, French BA, Kron IL. Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Mar;137(3):723–9.
25. Ham SY, Nam SB, Kwak YL, Kim TL, Park JK, Shim YH. Age-Related Difference in the Effect of Acute Hyperglycemia on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *J Gerontol Ser A [Internet]*. 2019 Jan 28 [cited 2023 May 11]; Available from: <https://academic.oup.com/biomedgerontology/advance-article/doi/10.1093/gerona/gly292/5267850>
26. Lu S, Liao Z, Lu X, Katschinski DM, Mercola M, Chen J, et al. Hyperglycemia Acutely Increases Cytosolic Reactive Oxygen Species via O-linked GlcNAcylation and CaMKII Activation in Mouse Ventricular Myocytes. *Circ Res [Internet]*. 2020 May 8 [cited 2023 May 11];126(10). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.119.316288>
27. Kobayashi S, Zhao F, Zhang Z, Kobayashi T, Huang Y, Shi B, et al. Mitochondrial Fission and Mitophagy Coordinately Restrict High Glucose Toxicity in Cardiomyocytes. *Front Physiol*. 2020 Dec 10;11:604069.

28. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci*. 2006 Feb 21;103(8):2653–8.
29. Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 15;79(2):341–51.
30. Mapanga RF, Joseph D, Symington B, Garson KL, Kimar C, Kelly-Laubscher R, et al. Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart. *Acta Physiol*. 2014 Mar;210(3):546–64.
31. Sedlic F, Muravyeva MY, Sepac A, Sedlic M, Williams AM, Yang M, et al. Targeted Modification of Mitochondrial ROS Production Converts High Glucose-Induced Cytotoxicity to Cytoprotection: Effects on Anesthetic Preconditioning: CYTOTOXICITY BY ACUTE HIGH GLUCOSE. *J Cell Physiol*. 2017 Jan;232(1):216–24.
32. Boulghobra D, Dubois M, Alpha-Bazin B, Coste F, Olmos M, Gayrard S, et al. Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2021 Dec 23;116(1):66.
33. Abrisch RG, Gumbin SC, Wisniewski BT, Lackner LL, Voeltz GK. Fission and fusion machineries converge at ER contact sites to regulate mitochondrial morphology. *J Cell Biol*. 2020 Apr 6;219(4):e201911122.
34. Yao L, Xie D, Geng L, Shi D, Huang J, Wu Y, et al. REEP5 (Receptor Accessory Protein 5) Acts as a Sarcoplasmic Reticulum Membrane Sculptor to Modulate Cardiac Function. *J Am Heart Assoc*. 2018 Feb 6;7(3):e007205.
35. Lee SH, Hadipour-Lakmehsari S, Murthy HR, Gibb N, Miyake T, Teng ACT, et al. REEP5 depletion causes sarco-endoplasmic reticulum vacuolization and cardiac functional defects. *Nat Commun*. 2020 Feb 19;11(1):965.
36. Kerselidou D, Dohai BS, Nelson DR, Daakour S, De Cock N, Hassoun ZAO, et al. Alternative glycosylation controls endoplasmic reticulum dynamics and tubular extension in mammalian cells. *Sci Adv*. 2021 May 7;7(19):eabe8349.
37. Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2015 Apr 28 [cited 2023 Jun 12];112(17). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1504880112>
38. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*. 2004 Jan;427(6972):360–4.
39. Hamilton S, Terentyeva R, Clements RT, Belevych AE, Terentyev D. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication; implications for cardiac arrhythmia. *J Mol Cell Cardiol*. 2021 Jul;156:105–13.
40. Heusch G. Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Dec;17(12):773–89.
41. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012 May 1;94(2):168–80.

42. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):372–6.
43. Curran J, Brown KH, Santiago DJ, Pogwizd S, Bers DM, Shannon TR. Spontaneous Ca waves in ventricular myocytes from failing hearts depend on Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Jul;49(1):25–32.
44. Hamilton S, Terentyeva R, Martin B, Perger F, Li J, Stepanov A, et al. Increased RyR2 activity is exacerbated by calcium leak-induced mitochondrial ROS. *Basic Res Cardiol*. 2020 Jul;115(4):38.
45. Dia M, Gomez L, Thibault H, Tessier N, Leon C, Chouabe C, et al. Reduced reticulum–mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. 2020 Dec;115(6):74.
46. Suarez J, Cividini F, Scott BT, Lehmann K, Diaz-Juarez J, Diemer T, et al. Restoring mitochondrial calcium uniporter expression in diabetic mouse heart improves mitochondrial calcium handling and cardiac function. *J Biol Chem*. 2018 May;293(21):8182–95.
47. Wu S, Lu Q, Ding Y, Wu Y, Qiu Y, Wang P, et al. Hyperglycemia-Driven Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase  $\alpha$ 2 Induces Diabetic Cardiomyopathy by Promoting Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes In Vivo. *Circulation*. 2019 Apr 16;139(16):1913–36.
48. Zhang N, Yu H, Liu T, Zhou Z, Feng B, Wang Y, et al. Bmal1 downregulation leads to diabetic cardiomyopathy by promoting Bcl2/IP3R-mediated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload. *Redox Biol*. 2023 Aug;64:102788.
49. Wu QR, Zheng DL, Liu PM, Yang H, Li LA, Kuang SJ, et al. High glucose induces Drp1-mediated mitochondrial fission via the Orai1 calcium channel to participate in diabetic cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Death Dis*. 2021 Feb 26;12(2):216.
50. Ding M, Dong Q, Liu Z, Liu Z, Qu Y, Li X, et al. Inhibition of dynamin-related protein 1 protects against myocardial ischemia–reperfusion injury in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2017 Dec;16(1):19.
51. Hu J, Zhang Y, Jiang X, Zhang H, Gao Z, Li Y, et al. ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019 Dec;38(1):225.
52. Kim DI, Lee KH, Gabr AA, Choi GE, Kim JS, Ko SH, et al. A $\beta$ -Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2016 Nov;1863(11):2820–34.
53. Yu T, Jhun BS, Yoon Y. High-Glucose Stimulation Increases Reactive Oxygen Species Production Through the Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Feb;14(3):425–37.
54. Cereghetti GM, Stangherlin A, de Brito OM, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Oct 14;105(41):15803–8.
55. Hom J, Yu T, Yoon Y, Porter G, Sheu SS. Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2010 Jun 1;1797(6):913–21.

56. Guan L, Che Z, Meng X, Yu Y, Li M, Yu Z, et al. MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion Injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy Inhibition. *J Cell Mol Med*. 2019 Nov;23(11):7830–43.
57. Kowaltowski AJ, Menezes-Filho SL, Assali EA, Gonçalves IG, Cabral-Costa JV, Abreu P, et al. Mitochondrial morphology regulates organellar Ca<sup>2+</sup> uptake and changes cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *FASEB J*. 2019;33(12):13176–88.
58. Gao P, Yan Z, Zhu Z. Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 9;8:604240.
59. Hegyi B, Fasoli A, Ko CY, Van BW, Alim CC, Shen EY, et al. CaMKII Serine 280 O-GlcNAcylation Links Diabetic Hyperglycemia to Proarrhythmia. *Circ Res*. 2021 Jun 25;129(1):98–113.
60. Nichtová Z, Fernandez-Sanz C, De La Fuente S, Yuan Y, Hurst S, Lanvermann S, et al. Enhanced Mitochondria-SR Tethering Triggers Adaptive Cardiac Muscle Remodeling. *Circ Res* [Internet]. 2023 May 26 [cited 2023 Jul 5];132(11). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.122.321833>
61. Bround MJ, Wambolt R, Luciani DS, Kulpa JE, Rodrigues B, Brownsey RW, et al. Cardiomyocyte ATP Production, Metabolic Flexibility, and Survival Require Calcium Flux through Cardiac Ryanodine Receptors in Vivo. *J Biol Chem*. 2013 Jun;288(26):18975–86.
62. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, Garcia-Dorado D. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1281–9.
63. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Crola Da Silva C, et al. Depressing Mitochondria-Reticulum Interactions Protects Cardiomyocytes From Lethal Hypoxia-Reoxygenation Injury. *Circulation*. 2013 Oct;128(14):1555–65.
64. Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, 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*. 2016 Jul;111(4):40.

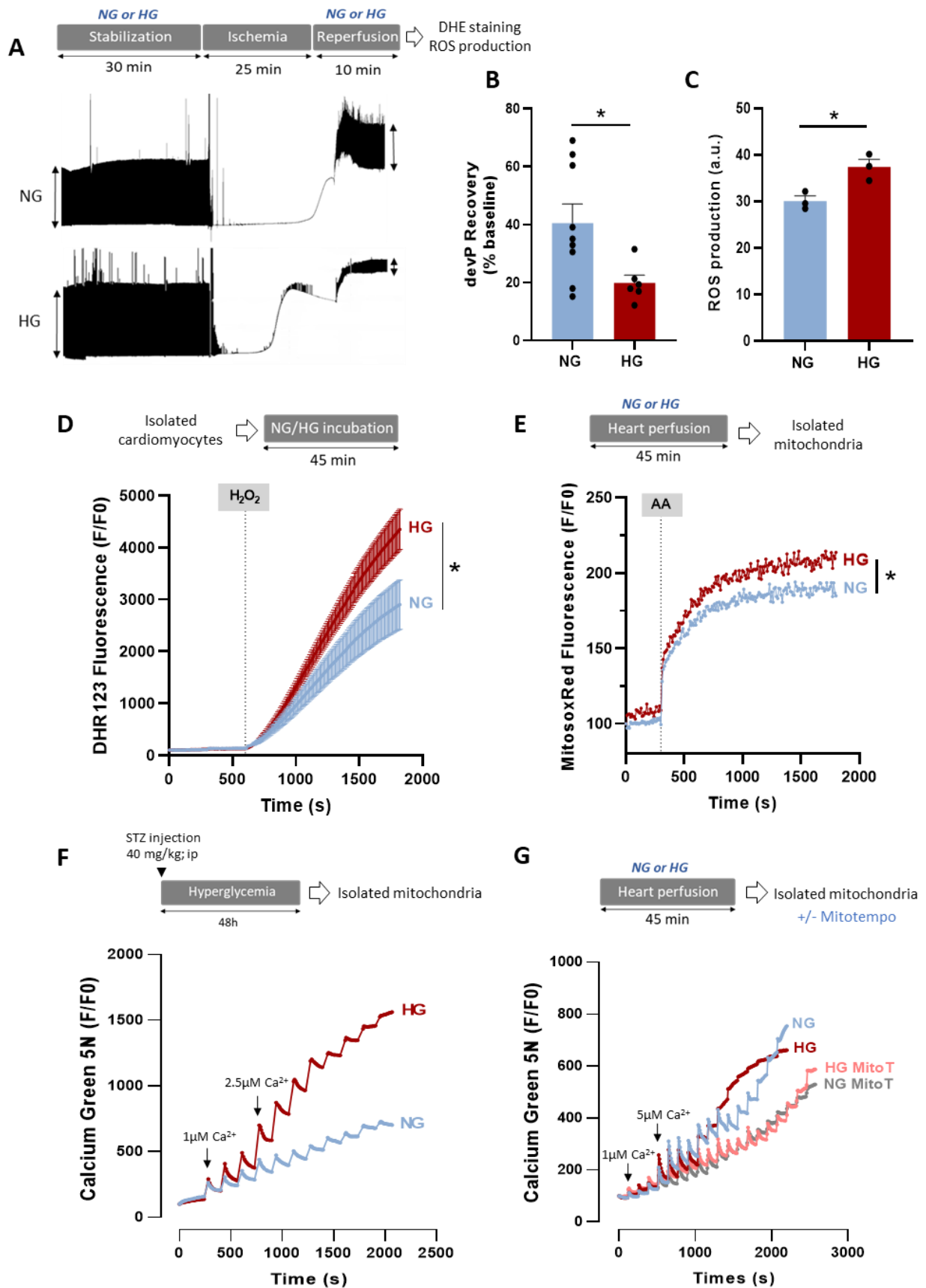


Figure 1

**Figure 1: Effect of hyperglycemia on ROS production and mitochondrial calcium retention capacity.** (A) Schematic illustration of the experimental protocol and representative traces of left ventricular (LV) pressure recording during IR on hearts perfused in normoglycemic (NG; 11mM) or hyperglycemic (HG; 33mM) buffer. Stabilization (30 min) in NG or HG buffer was followed by global no-flow ischemia (25 min) and reperfusion in NG or HG buffer (10 min). (B) LV developed pressure (devP) recovery at 10 min post-IR (n= 9 NG hearts, n= 6 HG hearts; \*p <0.05 NG vs. HG; non-parametric t-test). Values were normalized to the baseline level. (C) Evaluation of ROS production by staining heart tissue sections with DHE (10 $\mu$ M) following 10 min of IR (n= 3 hearts/group; \*p <0.05 NG vs. HG; non-parametric Mann-Whitney test). (D) Cardiomyocytes isolated from 5 hearts/group were loaded with the ROS-sensitive fluorescent DHR123 probe (5 $\mu$ M) and then incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer. Fluorescence intensity was measured every 10s and normalized to the baseline fluorescence (F/F<sub>0</sub>). Cardiomyocytes were stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M) to mimic IR-induced oxidative stress (\*p <0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA). (E) Mitochondria were isolated from hearts perfused in NG (11mM) or HG (33mM) buffer for 45 min (6 hearts/group) and were loaded with MitoSOX Red (5 $\mu$ M), a dye sensitive to mitochondrial ROS. Fluorescence was measured every 10s and normalized to the baseline fluorescence (F/F<sub>0</sub>). Mitochondria were stimulated with antimycin A (AA; 100 $\mu$ M), a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, to force ROS production (\*p <0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA). (F) Ca<sup>2+</sup> retention capacity (CRC) test in mitochondria isolated from the heart of NG rats (n = 20 experiments with 5 hearts) and HG rats (STZ; 40mg/kg) (n=32 experiments with 8 hearts). CRC was monitored using the Ca<sup>2+</sup> Green-5N probe (1 $\mu$ M). Each peak corresponds to Ca<sup>2+</sup> addition (3 CaCl<sub>2</sub> pulses at 1 $\mu$ M followed by pulses at 2.5 $\mu$ M; concentration changes are represented by black arrows). Fluorescence level was measured every 10s and normalized to the baseline fluorescence (F/F<sub>0</sub>). (G) CRC test in mitochondria isolated from hearts perfused with NG (11mM) or HG (33mM) buffer for 45min (23 experiments with 5 NG hearts; 19 experiments with 4 HG hearts). During CRC testing, mitochondria were incubated or not with MitoTEMPO (MitoT; 1 $\mu$ M; 9 experiments with 3 NG hearts; 12 experiments with 3 HG hearts).



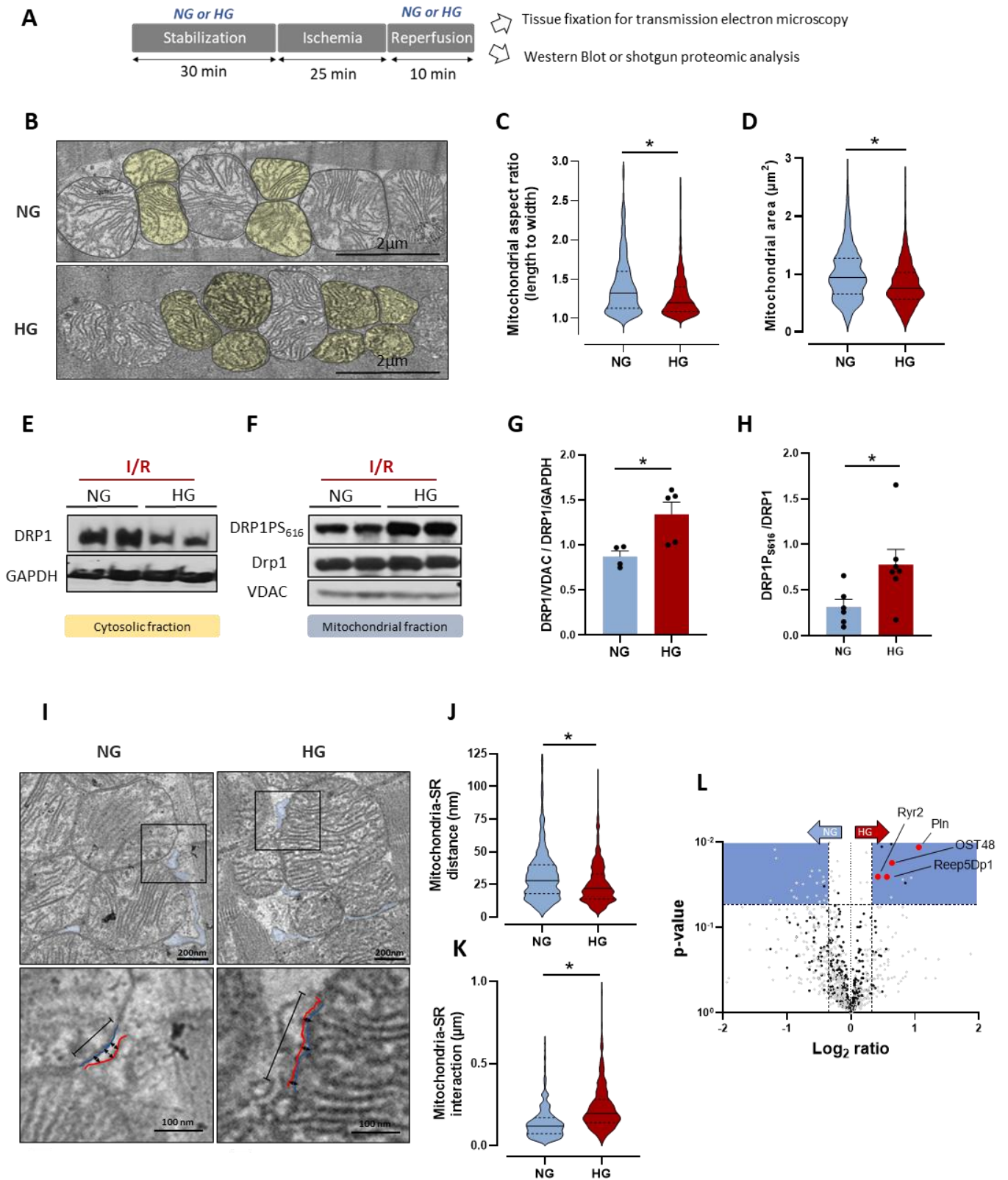


Figure 2

**Figure 2: Effect of hyperglycemia during IR on mitochondrial fission and interactions between mitochondria and sarcoplasmic reticulum.** (A) Schematic illustration of the experimental protocol. Hearts were stabilized in NG (11mM) or HG (33mM) buffer for 30 min, using a Langendorff apparatus. This was followed by global no-flow ischemia for 25min and reperfusion in NG or HG buffer for 10min. Heart tissues were used after 10min of reperfusion. (B) Representative transmission electron microscopy images of NG- and HG-perfused heart tissue sections. Yellow mitochondria correspond to fragmented mitochondria. Quantification of the mitochondrial aspect ratio (C) and area (D) of NG and HG mitochondria ( $n \approx 600$  mitochondria from 4 hearts/group;  $*p < 0.05$  NG vs. HG; non-parametric t-test). (E-F) Representative western blots of total DRP1 and GAPDH expression in cytosolic fractions (E) and of phosphorylated DRP1 (DRP1S616), total DRP1 (DRP1) and VDAC1 (VDAC) levels in mitochondrial subfractions (F) of NG- and HG-perfused hearts after IR. (G) Mitochondrial DRP1 (relative to VDAC1) to cytosolic DRP1 (relative to GAPDH) ratio in NG- ( $n=4$  in duplicate) and HG-perfused hearts ( $n=5$  in duplicate) after IR ( $*p < 0.05$  NG vs. HG; parametric t-test). (H) DRP1 phosphorylated on S616 (relative to total DRP1) in mitochondrial subfractions from NG- ( $n=6$  in duplicate) and HG-perfused ( $n=7$  in duplicate) hearts. Protein levels were expressed relative to VDAC1 ( $*p < 0.05$  NG vs. HG; parametric t-test). (I) Representative transmission electron microscopy images of interactions between mitochondria and sarcoplasmic reticulum (SR) in NG- and HG-perfused hearts after 10min of reperfusion. Black arrows: distance between mitochondria (blue line) and SR (red line). Black line: length of the interaction between a mitochondrion and SR. Quantification of the mitochondrion-SR distance (J) and interactions (K) in NG- and HG-perfused hearts after IR ( $n \approx 400-500$  measurements from  $N=4$  hearts/group;  $*p < 0.05$  NG vs. HG; non-parametric t-test). (L) Volcano plot showing the  $-\log_{10} p$  value vs. the  $\log_2$  expression levels of individual proteins in mitochondrial subfractions obtained from NG- and HG-perfused hearts after IR. Red dots: SR proteins; black dots: mitochondrial proteins; gray dots: non-mitochondrial proteins; blue squares: cut-offs of fold change  $> 1.4$ ,  $p < 0.05$ .



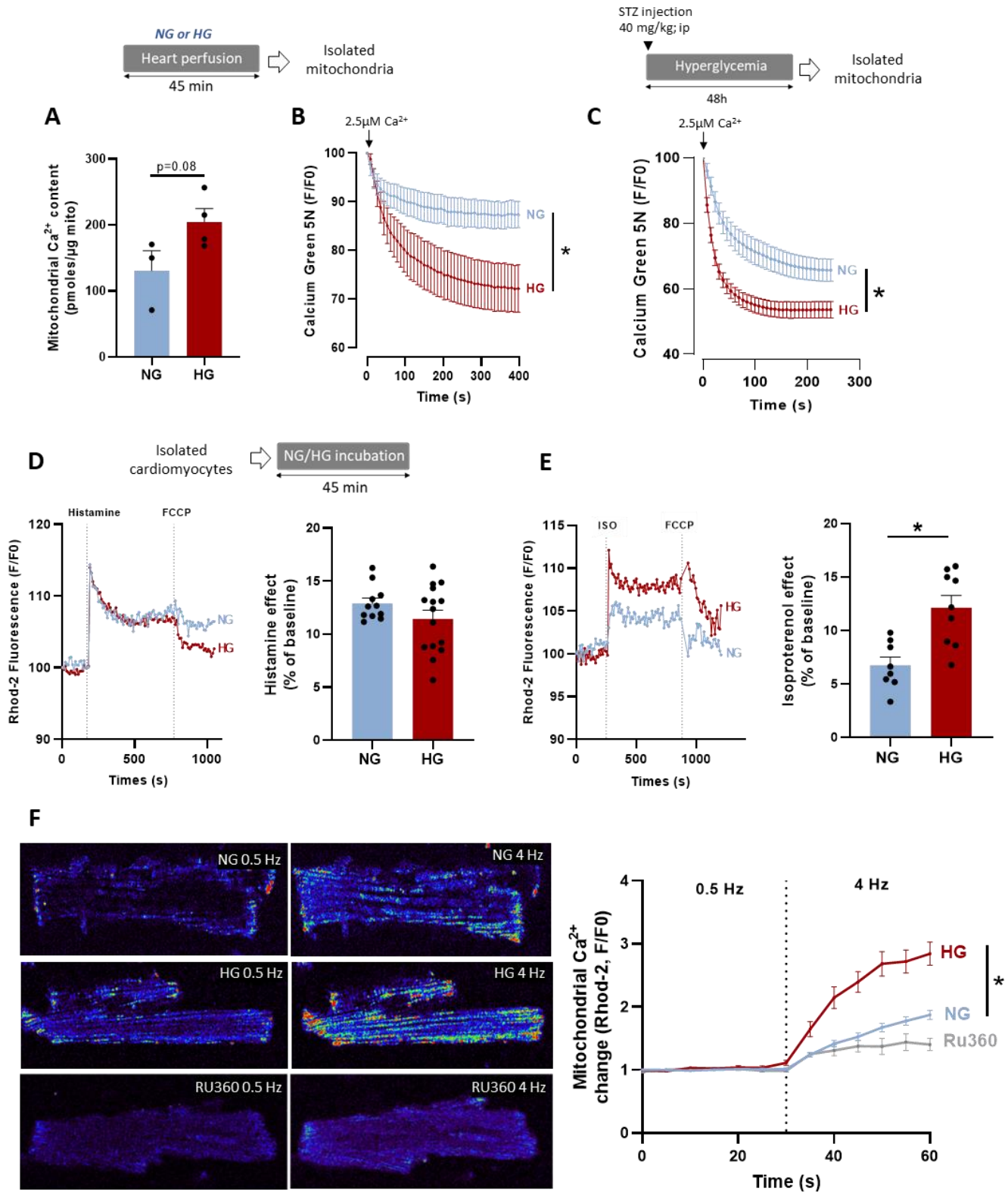


Figure 3

**Figure 3: Effect of hyperglycemia on mitochondrial calcium uptake.** (A) Quantification of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  content using the o-Cresolphthalein-Complexone method in mitochondria isolated from NG- (11mM) and HG- (33mM)-perfused hearts (n=3 NG hearts; n=4 HG hearts, in triplicate; \*p <0.05 NG vs. HG; parametric t-test). (B) Mean traces of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by isolated mitochondria, using  $\text{Ca}^{2+}$  Green-5N (1 $\mu\text{M}$ ) as an extra-mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  indicator. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was induced by adding 2.5 $\mu\text{M}$  of  $\text{CaCl}_2$  to mitochondria isolated from NG- or HG-perfused hearts (n= 12 experiments with 3 hearts/group). Fluorescence was measured every 7s and normalized to the peak fluorescence (F/Fpeak) (\*p <0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA). (C) Mean traces of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria isolated from control rat hearts (NG; n= 35 experiments with 7 independent rats) and STZ-treated (HG) rat hearts (STZ; 40mg/kg; n = 45 experiments with 9 independent rats). Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was induced by adding 2.5 $\mu\text{M}$  of  $\text{CaCl}_2$  to mitochondria. Fluorescence was measured every 10s and normalized to the peak fluorescence (F/Fpeak) (\*p <0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA). (D) *Left panel*, mean traces of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  measured in isolated cardiomyocytes incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer, using Rhod-2 (5 $\mu\text{M}$ ) as mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive probe.  $\text{Ca}^{2+}$  release by the SR was stimulated with histamine (500 $\mu\text{M}$ ). *Right panel*, quantification of histamine effect on mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  level change from baseline (F/F0). (E) *Left panel*, mean traces of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  measured in isolated cardiomyocytes incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer, using Rhod-2 (5 $\mu\text{M}$ ) as mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive probe.  $\text{Ca}^{2+}$  release by the SR was stimulated with isoproterenol (ISO; 1 $\mu\text{M}$ ). *Right panel*, quantification of ISO effect on mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  level changes relative to baseline (F0) (\*p <0.05 NG vs. HG; parametric t-test). (F) Confocal images of rat cardiomyocytes, loaded with Rhod-2 (5 $\mu\text{M}$ ) and incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer for 45 min. Cardiomyocytes were paced (19V) at 0.5Hz (30sec) and 4Hz (30sec) to stimulate excitation-contraction coupling and mitochondrial accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$ . Fluorescence was measured every 5s for 60s and was normalized to the baseline value (F0) (n $\approx$ 23-28 cells per condition from N=3 hearts). Some cardiomyocytes were incubated with Ru360 (10 $\mu\text{M}$ ), a MCU inhibitor (\*p<0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA).

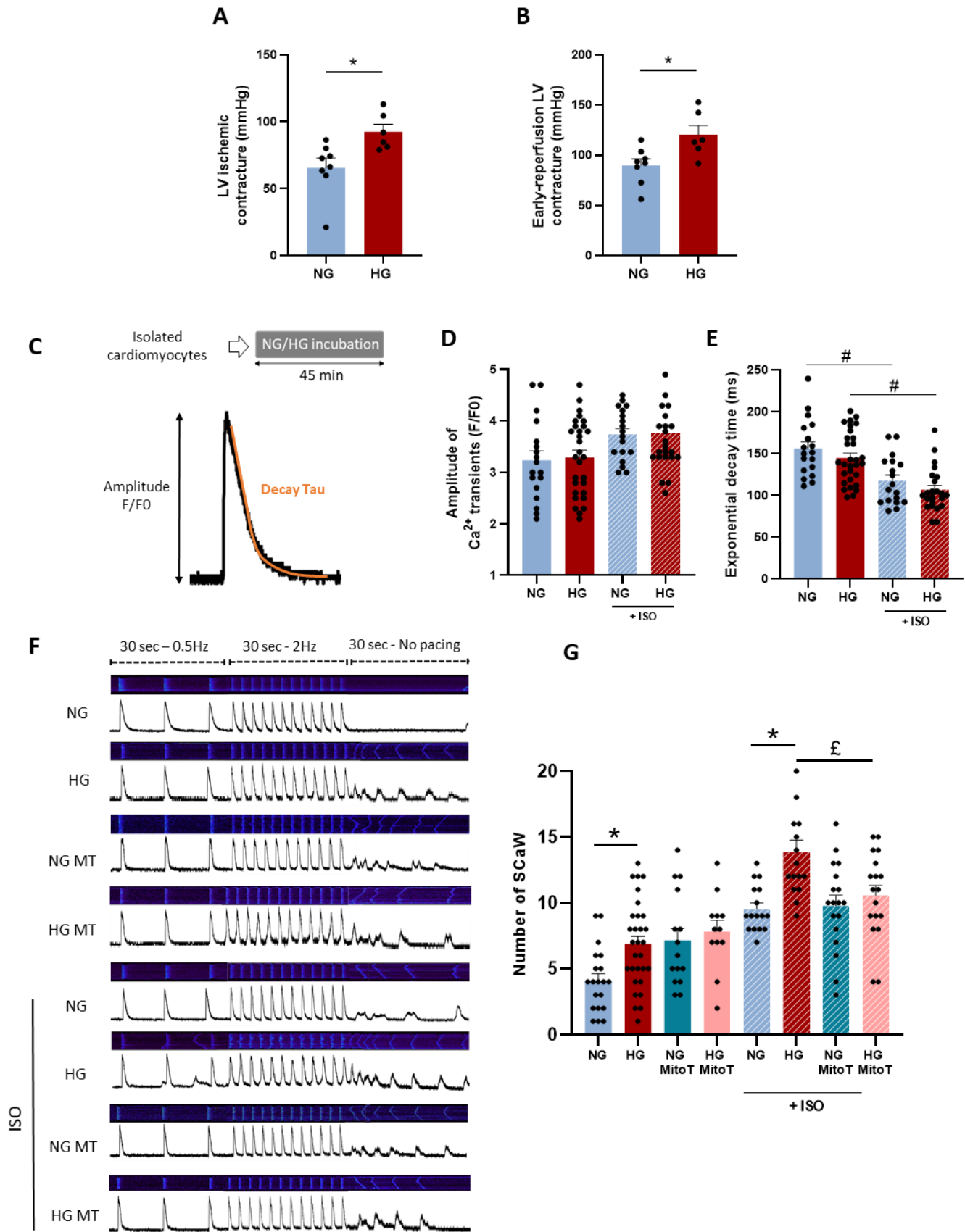


Figure 4

**Figure 4: Hyperglycemia effect on calcium homeostasis in response to stress.** (A) Maximum ischemic and (B) early-reperfusion LV contracture (10min reperfusion vs. baseline) in isolated hearts undergoing IR in NG (11mM) or HG (33mM) conditions (n= 8 NG hearts; n= 6 HG hearts; \*p <0.05 NG vs. HG; parametric t-test). (C) Representative trace of a Ca<sup>2+</sup> transient obtained in paced (0.5Hz, Ionoptix System) isolated cardiomyocytes loaded with the Fluo-4 Ca<sup>2+</sup> sensitive dye (10μM). (D) Amplitude of Ca<sup>2+</sup> transients measured in isolated cardiomyocytes pre-incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer, paced at 0.5 Hz for 30s, and stimulated or not with ISO (1μM) (n=20-30 cells/condition from 4 hearts). (E) Ca<sup>2+</sup> transient exponential decay time (Tau) measured in isolated cardiomyocytes incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer for 45min, paced at 0.5 Hz for 30s and stimulated or not with ISO (1μM) (n=20-30 cells/condition from 4 hearts; #p <0.05 ISO effect; repeated two-way ANOVA). (F) Representative confocal line scans obtained in isolated cardiomyocytes loaded with the intracellular Ca<sup>2+</sup> sensitive dye Fluo-4 AM (10μM) and incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer for 45min before analysis. Cardiomyocytes were pre-incubated or not with MitoTEMPO (1μM) for 30min and stimulated or not with ISO (1μM). Cells were paced at 0.5Hz for 30s followed by 30s at 2Hz (19V). The stimulation was then stopped to record spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves (SCaW) for 30s. (G) SCaW number over 30s in the conditions previously described (n=15-30 cells/condition from 3-6 hearts; \*p <0.05 NG vs. HG, #p <0.05 MitoT effect; repeated two-way ANOVA).

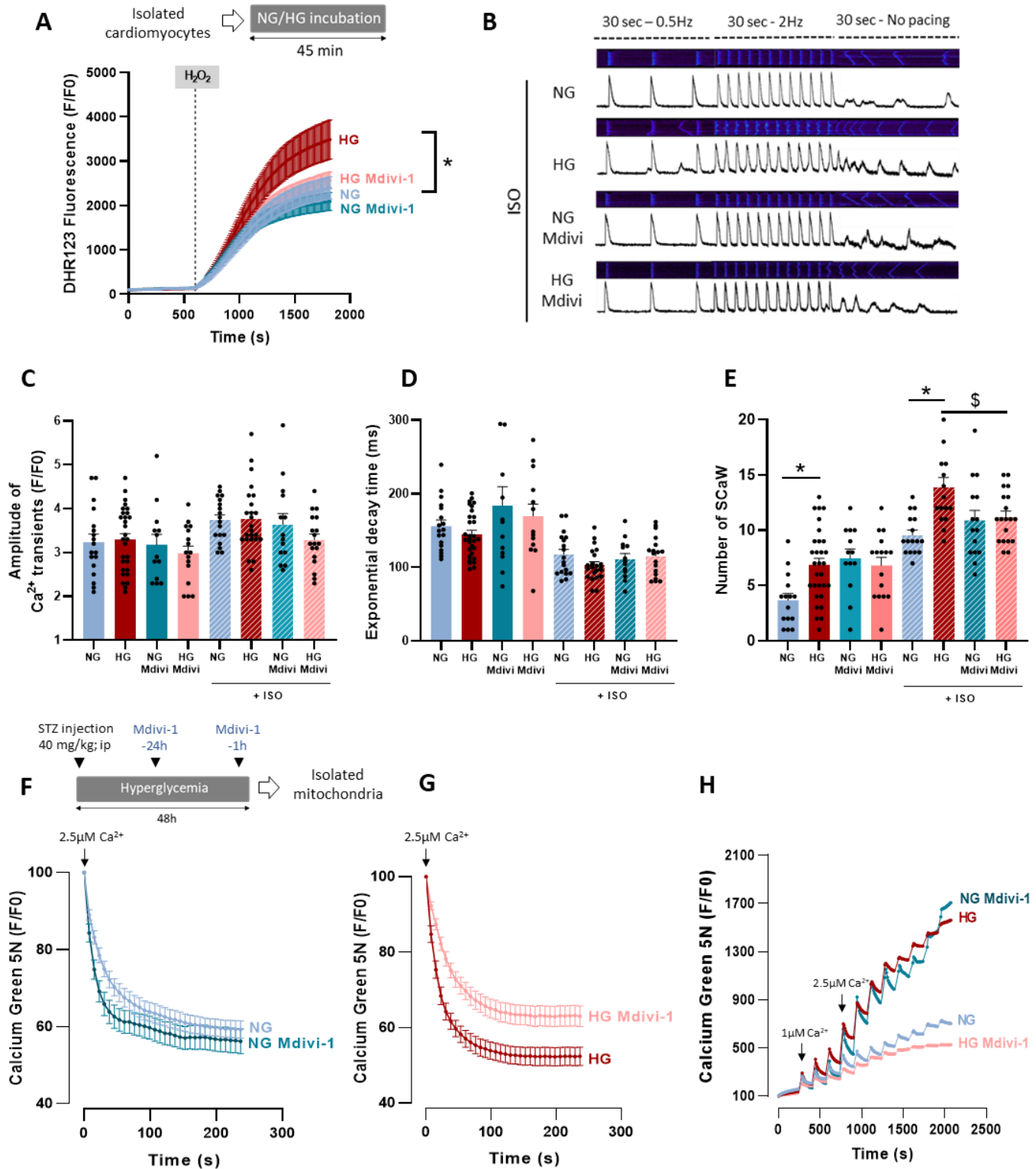


Figure 5

**Figure 5: Effect of the DRP1 inhibitor Mdivi-1 on hyperglycemia-induced alterations of ROS production, calcium homeostasis, and mPTP opening in cardiomyocytes.** (A) Cardiomyocytes isolated from 4 hearts/group were loaded with the ROS-sensitive fluorescent probe dihydro-rhodamine 123 (DHR123; 5 $\mu$ M) and then incubated or not with Mdivi-1 (50 $\mu$ M, 30min), in NG (6mM) or HG (33mM) buffer, for 45min. Cells were stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M) to mimic IR-induced oxidative stress. Fluorescence was measured every 10s and normalized to baseline fluorescence (F/F<sub>0</sub>) (\*p <0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA). (B) Representative confocal line scan recording of Ca<sup>2+</sup> transients and spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves obtained in isolated cardiomyocytes loaded with the intracellular Ca<sup>2+</sup> indicator Fluo-4 AM (10 $\mu$ M) and incubated in NG (6mM) or HG (33mM) buffer for 45min. Cardiomyocytes were paced at 0.5Hz (30s) and 2Hz (30s). The stimulation was then stopped to record SCaW for 30s. Cardiomyocytes were pre-incubated or not with Mdivi-1 (50 $\mu$ M) for 30min and stimulated or not with ISO (1 $\mu$ M). Quantification of the amplitude of Ca<sup>2+</sup> transients (C), exponential decay time (Tau) (D) and number of SCaW (E) in isolated cardiomyocytes (n=15-30 cells/condition from 3-6 hearts; \*p <0.05 NG vs. HG, \$p <0.05 Mdivi-1 effect; repeated two-way ANOVA). (F-G), Mean traces of Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria isolated from NG rat hearts (n= 35 experiments from N=7 hearts) or STZ-treated rat (NG) hearts (STZ; 40mg/kg; n= 45 experiments from N=9 hearts), treated or not with Mdivi-1, 24h and 1h before the experiment (NG Mdivi-1: n=19 experiments from N=4 hearts. HG Mdivi-1: n=20 experiments from N=3 hearts). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake was stimulated by a single CaCl<sub>2</sub> pulse (2.5  $\mu$ M) in isolated mitochondria in the presence of Ca<sup>2+</sup> Green-5N (1 $\mu$ M). Fluorescence was measured every 7s and normalized to the peak fluorescence. (H) Mean CRC traces in mitochondria isolated from NG rats (n=20 experiments from N=5 hearts) or STZ-treated rats (HG; n=32 experiments from 8 hearts), treated or not with Mdivi-1 (50 $\mu$ M) (NG Mdivi-1: n=16 experiments from N= 4 hearts; HG Mdivi-1: n=12 experiments from N=3 hearts). CRC was monitored using the Ca<sup>2+</sup> Green-5N probe (1 $\mu$ M). Each peak corresponds to Ca<sup>2+</sup> addition (3 CaCl<sub>2</sub> pulses at 1 $\mu$ M followed by pulses at 2.5 $\mu$ M; changes in concentration are represented by black arrows).



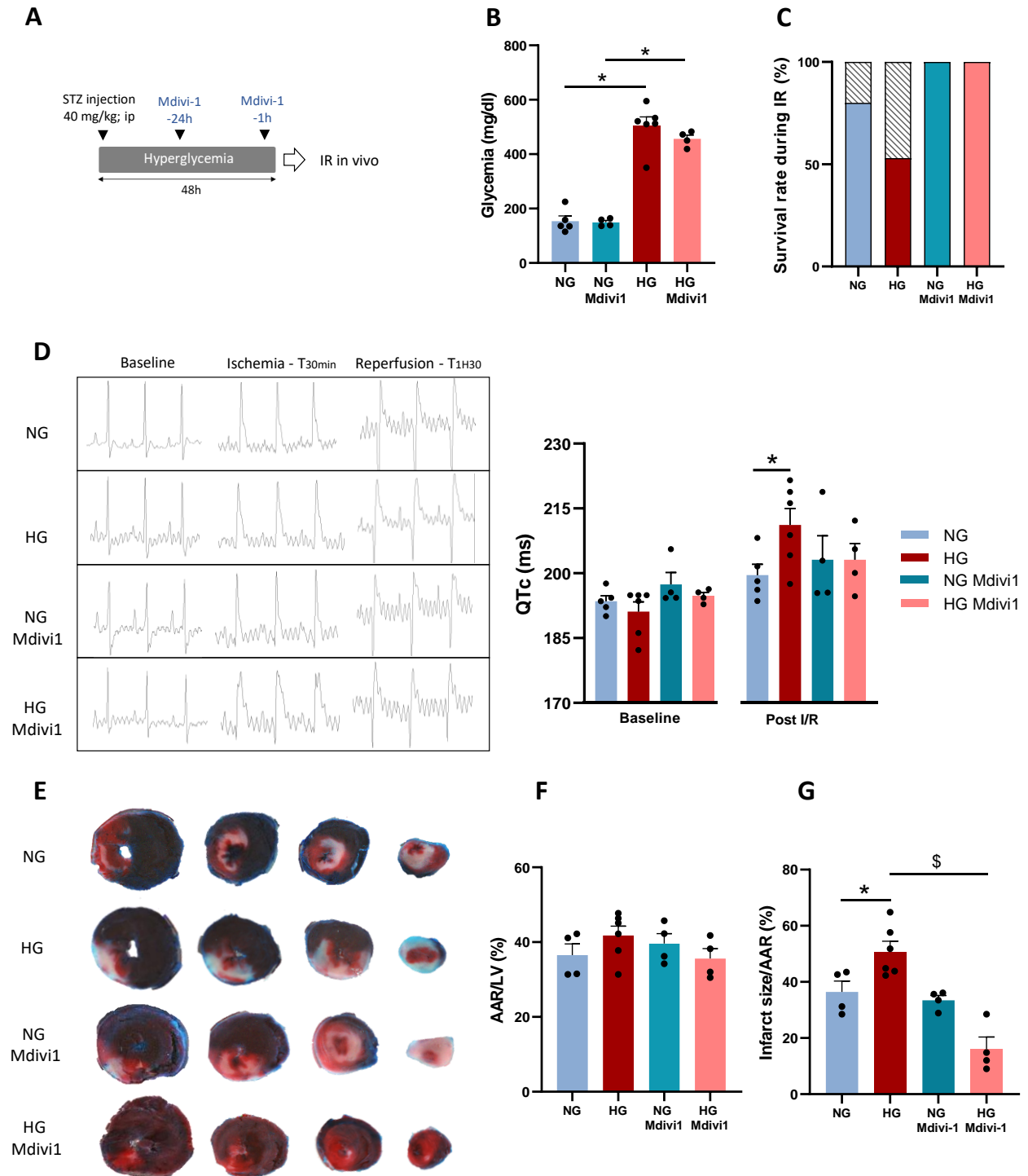


Figure 6

**Figure 6: Effect of the DRP1 inhibitor Mdivi-1 on the hyperglycemia-induced heart sensitivity to IR.** (A) Control rats (NG) and STZ-treated rats (HG) were treated or not with Mdivi-1 (1.2mg/kg; intraperitoneal injection), 24h and 1h before *in vivo* IR (30min of ischemia followed by 2h of reperfusion). (B) Blood glucose levels before IR (N=4-6 rats/group; \*p <0.05 NG vs. HG; two-way ANOVA). (C) Animal survival rate (no cardiac arrest before the reperfusion end) during IR (N=4-6 rats/group). (D) *Left panel*, representative ECG recording before ischemia (baseline), after 30min of ischemia (coronary artery ligation), and after reperfusion (1h30) in NG and HG rats pre-treated or not with Mdivi-1 (1.2mg/kg; intraperitoneal injection) 24h and 1h before coronary artery ligation. *Right panel*, QTc values recorded at baseline and after 1h30 reperfusion (4-6 rats/group; \*p <0.05 NG vs. HG post-IR; repeated two-way ANOVA). (E) Representative transverse sections of triphenyl tetrazolium chloride-stained hearts from NG or HG rats treated or not with Mdivi-1 (1.2mg/kg). The deep red visible area represents the area at risk (AAR), the white area is the infarcted area, and the blue area indicates non-ischemic tissue. (F) AAR percentage, calculated as the AAR to LV size ratio, in each group (N=4-6 hearts/group). (G) Percentage of infarct size, calculated as the infarcted area to the AAR ratio in each group (n=4-6 rats/group; \$p <0.05 Mdivi-1 effect; two-way ANOVA).



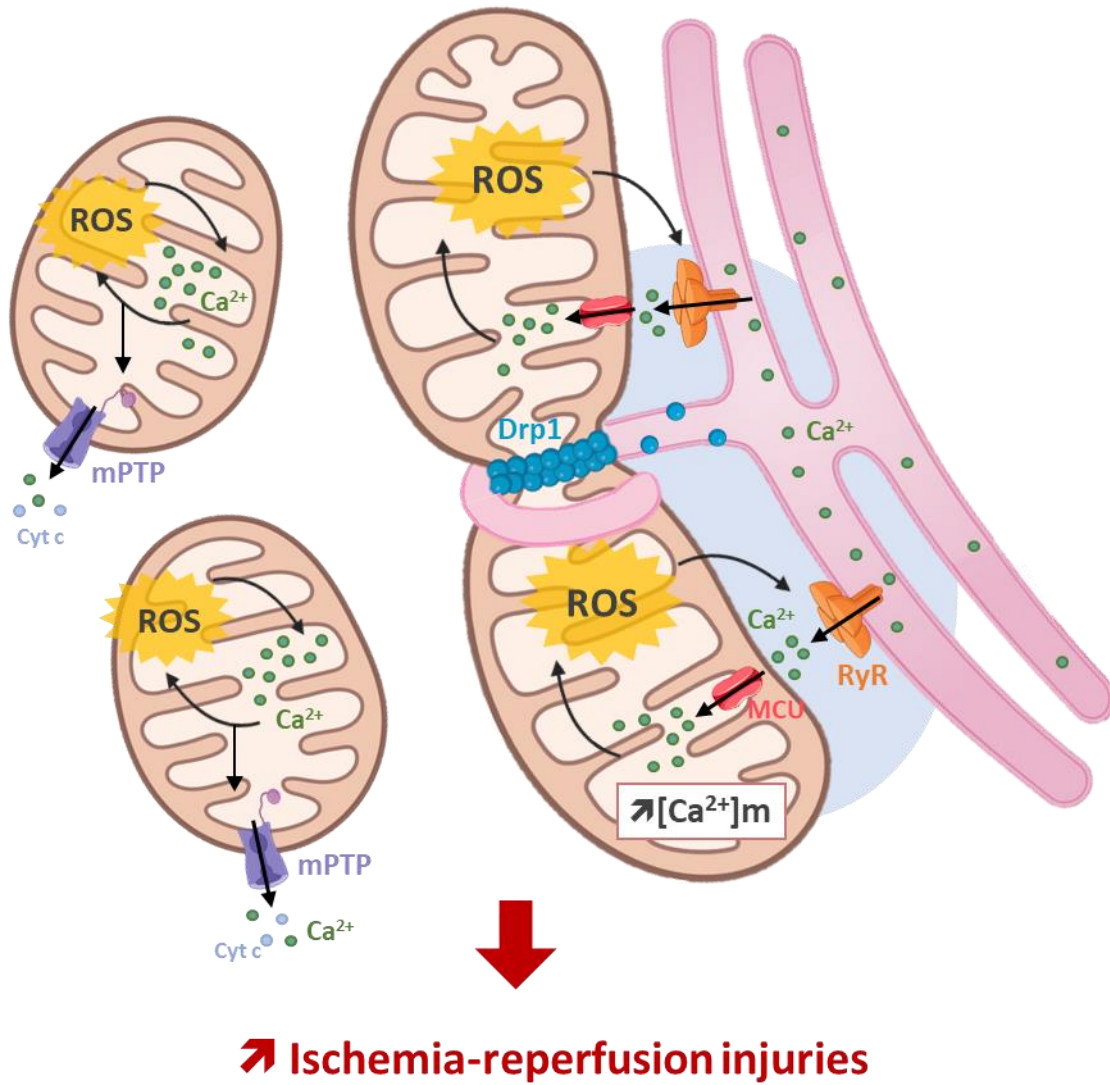
**HYPERGLYCEMIA**

Figure 7

**Figure 7: Hyperglycemia-induced DRP1 activation plays a central role in the deleterious impact of hyperglycemia on the heart sensitivity to IR.** Hyperglycemia increases the interactions between sarcoplasmic reticulum and mitochondria, leading to excessive mitochondrial fission. The proximity of these two organelles promotes mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and triggers the complex interplay between mitochondrial ROS production and RyR2  $\text{Ca}^{2+}$  leak. Finally, this vicious circle can constitute a key trigger of the long-lasting mPTP opening and IR injuries in hyperglycemia. DRP1, through its canonical role in mitochondrial fission or its non-canonical role in the interactions between sarcoplasmic reticulum and mitochondria, seems to be a key trigger of the vicious circle between mitochondrial ROS overproduction and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis alterations. These results suggest that DRP1 plays a key role in the higher heart sensitivity to IR injuries. Therefore, its inhibition could be a potential therapeutic target to limit the deleterious impact of hyperglycemia in patients with acute myocardial infarction.

## SUPPLEMENTAL MATERIALS

### Animal model

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee (N° CEEA-32041 and CEEA-27001).

For in vivo experiments, male Wistar rats (12-week-old; weight=250-275 g, Janvier, France) were randomly distributed in two groups: normoglycemic group (NG) that received an injection of vehicle (citrate buffer), and hyperglycemic group (HG) that received a single injection of streptozotocin (STZ, 40mg/kg, Sigma Aldrich S0130) intraperitoneally. Two days after injection, blood glucose levels were measured and the experiments were performed.

### In vivo IR

In vivo IR was performed as previously described (1). To evaluate the role of the DRP1 pathway in heart sensitivity to IR injuries, NG and HG rats received one intraperitoneal injection of vehicle (DMSO) or Mdivi-1 (1.2 mg/kg in DMSO; Sigma-Aldrich M0199) 24h and 1h before ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery. Briefly, after anesthesia, NG and HG rats received an injection of buprenorphine subcutaneously (0.1mg/kg), were endotracheally intubated and mechanically ventilated (respiratory rate of 60 breaths/min by volume cycled mechanical ventilation). Then, a thoracotomy was performed to expose the LAD coronary artery that was subsequently ligated with a 5-0 silk suture for 30min, followed by 120min of reperfusion. The ECG signal was recorded with electrodes placed on the skin surface. Heart rate and QT intervals were measured at baseline and after 1h30 of reperfusion. The corrected QT (QTc) was calculated according to the Framingham Heart Study method in which the QT interval is adjusted to the heart rate:  $QTc = QT + 0.154 \times [1 - RR]$ . After reperfusion, the ligation was undone and 2.5ml of 5% Evan's blue dye was injected through the jugular vein to visualize the area at risk (AAR) in the left ventricle. The heart was stored in the freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 1h and was then cut horizontally in five slices from the apex to the occlusion site. Myocardial infarct size was determined by triphenyl tetrazolium chloride staining (TTC; 0.1%). The red visible area represents the AAR, the white color is the infarct area, and the blue area indicates non-ischemic tissue. The infarct size and AAR were measured in a blinded manner using the ImageJ software.

### Isolated perfused hearts

Isolated heart perfusion was performed as previously described (2). Briefly, hearts were excised quickly, placed in ice-cold Krebs-Henseleit buffer (KH; 118 mM NaCl, 11 mM D-glucose, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4) and perfused retrogradely using a Langendorff apparatus at constant perfusion pressure (80mmHg). Hearts were paced at 300 beats/min (Low voltage stimulator, BSL MP35 SS58L, 3V) and a non-compliant balloon

was inserted into the left ventricle (LV) to monitor the LV pressure. Hearts were stabilized for 30min in normoglycemic (NG; 11mM D-glucose) KH buffer and then perfused in NG, hyperglycemic (HG; 33mM D-glucose), or mannitol (Man; 22mM mannitol + 11 mM D-glucose) KH buffer for 45min.

For experiments using isolated mitochondria, hearts were directly perfused in NG, HG or Man KH buffer for 45min.

IR in isolated hearts was performed on a Langendorff apparatus as previously described (3). Briefly, after stabilization in NG (11mM) or HG (33mM) KH buffer, isolated rat hearts underwent global ischemia for 25min, followed by 10min of reperfusion in NG or HG KH buffer. The LV pressure was recorded (MP36R, BioPac System Inc) during the entire perfusion and the cardiac functional recovery following IR was determined. Heart tissues were collected and flash-frozen in liquid nitrogen for biochemical experiments (western blotting, proteomic approaches), histological fluorescence staining, or fixed in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1M) for transmission electron microscopy analysis.

### **Isolated cardiomyocytes**

LV cardiomyocytes were isolated as previously described (4). Briefly, the heart was rapidly excised, rinsed in ice-cold Hanks-HEPES buffer (117 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 4.4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 21 mM HEPES, 6 mM D-glucose, 20 mM taurine, pH 7.15), mounted on a Langendorff perfusion system and perfused at 37°C, first with Hanks-HEPES buffer for 5min to eliminate blood, and then with Hanks-HEPES buffer supplemented with 1.2 mg/mL collagenase type 4 (Worthington, Entraigues, France) for 18–23min. Small pieces of LV were dissected and mechanically dissociated. The Ca<sup>2+</sup> concentration was gradually increased to 1mM Ca<sup>2+</sup> and cells were used within the day. Experiments were performed in the same solution with 1.8mM Ca<sup>2+</sup>.

### **Isolated mitochondria**

Cardiac mitochondria were isolated as previously described (5). Hearts were quickly weighed and minced in 1.2 mL of mitochondria isolation buffer (300 mM saccharose, 5 mM TES, 0.2 mM EGTA, 1 mM bovine serum albumin (BSA); pH 7.2) and homogenized briefly on ice with a Polytron homogenizer (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik). Homogenates were centrifuged at 1,000 g, 4°C, for 10min. Supernatants were collected and centrifuged at 12,000 g, 4°C, for 15min. Pellets (mitochondrial fraction) were collected and resuspended in isolation buffer. Protein concentration was determined with the Bicinchoninic acid reagent (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific) using BSA as standard.

## **Measurement of ROS production**

### **Measurement of ROS production after ex vivo IR using the DHE fluorescent dye**

Cardiac ROS production was measured as previously described (2). LV sections were covered with 10 $\mu$ M dihydroethidium (DHE; Ex: 488 nm; Em: 610 nm, Sigma Aldrich 37291) at 37°C for 5min and images were acquired with a fluorescence microscope (EVOS M5000 Invitrogen Thermo Fisher Scientific).

### **Measurement of ROS production in isolated cardiomyocytes**

Isolated adult cardiomyocytes (100,000 cells/mL) were incubated at 37°C in Hanks-Hepes buffer (1mM Ca<sup>2+</sup>) with the ROS-sensitive fluorogenic probe, dihydrorhodamine 123 (DHR123; 5 $\mu$ M; Ex: 508nm; Em:529nm; Fisher Scientific, Invitrogen, D23806) for 30min. Then, cells were washed with Hanks-Hepes buffer (1.8mM Ca<sup>2+</sup>) to remove free DHR123, and were incubated in normoglycemic (NG; 6mM) or hyperglycemic (HG; 33mM) Hanks-Hepes buffer (1.8mM Ca<sup>2+</sup>) for 45min. Some cardiomyocytes were incubated in L-glucose Hanks-Hepes buffer (11mM D-glucose + 22 mM L-glucose), used as osmotic control. Some cardiac myocytes were incubated with the mitochondrial fission inhibitor Mdivi-1 (50 $\mu$ M; Sigma Aldrich M0199), or the NOX2-specific inhibitor GSK-2795039 (25 $\mu$ M; MedChem HY-18950) at 37°C for 30min. Cardiomyocyte ROS production was evaluated with a microplate reader (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX) in basal conditions and after stimulation with 100 $\mu$ M H202 (Sigma Aldrich, H1009) to mimic IR-induced oxidative stress.

### **Measurement of mitochondrial ROS production (mtROS) in isolated mitochondria**

After 45min of perfusion in NG (11mM) or HG (33mM) KH buffer, isolated hearts were collected and cardiac mitochondria were isolated as above and previously described (2). Mitochondria (750 $\mu$ g/mL) were diluted in E-buffer (200 mM saccharose, 5 mM succinate, 10 mM MOPS, 0.010 mM EGTA, 1 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) and incubated with MitoSOX Red, a fluorogenic probe sensitive to mtROS production (5  $\mu$ M, Ex: 510 nm; Em: 580 nm; Fisher Scientific, Invitrogen, M36008) at 30 °C for 15min. Then, mitochondria were washed with E-buffer to remove free MitoSOX, and were immediately transferred to a microplate reader (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX). Mitochondria were stimulated with Ca<sup>2+</sup> (5 $\mu$ M) and antimycin A (100  $\mu$ M, Sigma-Aldrich A8674), a complex III inhibitor, to force mtROS production.

### **Measurement of Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca<sup>2+</sup> retention capacity in isolated mitochondria**

Cardiac mitochondria were isolated as previously described (2) from hearts perfused with NG (11mM), HG (33mM) or mannitol (osmotic control; 22mM Mannitol + 11 mM D-Glucose) KH buffer for 45min. Some hearts were perfused with MitoTEMPO (MitoT; 1 $\mu$ M, Sigma Aldrich, SML0737), a specific mitochondrial antioxidant. For in vivo experiments, mitochondria were isolated from hearts of control

(NG; injection of citrate buffer) or STZ-treated rats (HG; STZ, 40mg/kg in citrate buffer, intraperitoneal injection) treated with vehicle (DMSO, intraperitoneal injection) or Mdivi-1 (1.2 mg/kg in DMSO, intraperitoneal injection; Sigma Aldrich M0199) at 24h and 1h before cardiac mitochondria isolation. Calcium retention capacity was evaluated as previously described (5) using the fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator Calcium Green-5N (1 μM; Ex: 507nm; Em:536nm Fisher Scientific Invitrogen, C3737) as extra-mitochondrial calcium probe. Mitochondria (750μg/mL) were diluted in E-buffer with or without MitoT (1μM, Sigma Aldrich, SML0737), to inhibit mtROS production. Calcium Green-5N was added and regular pulses of calcium chloride (1μM to 5μM) were added to induce mPTP opening. In some experiments, mitochondria were incubated with cyclosporine A (CsA; 2μM, Sigma Aldrich, 30024), an inhibitor of mPTP opening to confirmed that our test was well designed. Finally, mitochondrial calcium uptake was determined in isolated mitochondria loaded with Calcium Green-5N and incubated with inhibitors of mPTP (CsA, 2μM) or the mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger NCX (CGP37157; 10μM; MedChem, HY-15754) to block Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria was measured after a single 2.5μM Ca<sup>2+</sup> pulse. Calcium Green-5N fluorescence was measured throughout the experiments with a microplate reader (Thermo Scientific, Varioskan™ LUX).

#### **Measurement of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in isolated cardiomyocytes**

Isolated cardiomyocytes (100,000 cells/mL) were loaded with Rhod2-AM (5 μM; Ex: 553nm; Em:576nm; Abcam ab142780), a mitochondrial Ca<sup>2+</sup> indicator, in Hanks-Hepes buffer (1mM Ca<sup>2+</sup>), in the presence of 0.02% (wt/vol) pluronic acid (Fisher Scientific, Invitrogen), at 37°C for 30min. Then, cells were washed with Hanks-Hepes buffer (1.8mM Ca<sup>2+</sup>) to remove free of Rhod-2 and de-esterified, followed by incubation in normoglycemic (NG; 6mM) or hyperglycemic (HG; 33mM) Hanks-Hepes buffer (1.8mM Ca<sup>2+</sup>) at 37°C for 45min. Some cardiomyocytes were incubated in mannitol Hanks-Hepes buffer (22mM mannitol + 11 mM D-glucose), as osmotic control. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake was recorded after isoproterenol (ISO, 1μM; Sigma Aldrich I5627) or histamine (500μM; Sigma Aldrich H7250) stimulation or during an electrical field stimulation (Myopacer, Ionoptix system). In this case, cardiomyocytes were paced (19V) at 0.5Hz for 30s followed by 30s at 4 Hz to stimulate Ca<sup>2+</sup> accumulation in the mitochondrial matrix. FCCP (100μM, Sigma Aldrich, C2920), a potent uncoupler of oxidative phosphorylation. or RU360 (10μM, Sigma Aldrich 557440), a MCU inhibitor, were used to confirm that Rhod2 fluorescence can be used as an index of mitochondrial calcium changes. Intracellular Ca<sup>2+</sup> imaging was performed by confocal microscopy (LEICA SP8, 3A AU/INRAE microscopy facility; x63 objective) in line-scan mode or using a microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Varioskan™ LUX).



**Measurement of Ca<sup>2+</sup> transients and spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves in paced isolated cardiomyocytes.**

Isolated cardiomyocytes (100,000 cells/mL) were loaded with Fluo-4 AM dye (10  $\mu$ M, Ex: 494nm; Em: 516nm; Thermo Fisher Scientific Invitrogen, F14201), a cytosolic Ca<sup>2+</sup> indicator, in Hanks-Hepes buffer (1mM Ca<sup>2+</sup>), in the presence of 0.02% (wt/vol) pluronic acid, at 37°C for 30min. Then, cells were washed to eliminate free Fluo-4 AM and de-esterified in Hanks-Hepes buffer (1.8mM Ca<sup>2+</sup>). Myocytes were incubated in normoglycemic (NG; 6mM) or hyperglycemic (HG; 33mM) Hanks-Hepes buffer (1.8mM Ca<sup>2+</sup>) at 37°C for 45min. Some cardiomyocytes were incubated in mannitol Hanks-Hepes buffer (22mM mannitol + 11 mM D-glucose), as osmotic control. Cardiomyocytes were incubated or not with MitoT (1 $\mu$ M; Sigma Aldrich SML0737) or Mdivi-1 (50 $\mu$ M, Sigma Aldrich) at 37°C for 30min. For recording Ca<sup>2+</sup> waves, cardiomyocytes were electrically stimulated (19V) at 0.5Hz for 30s, followed by 30s at 2Hz. Then, stimulation was stopped to record spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves (SCaW), used as an index of RyR2 instability. Intracellular Ca<sup>2+</sup> imaging was performed by confocal microscopy (LEICA SP8, 3A AU/INRAE microscopy facility; x63 objective) in line-scan mode. Images were analyzed with the LASX software.

**Mitochondrial matrix Ca<sup>2+</sup> concentration**

Cardiac mitochondria were isolated as previously described (2) from hearts perfused in NG (11mM) or HG (33mM) KH buffer for 45min. Isolated mitochondria were resuspended in isolation buffer without EGTA (300 mM sucrose, 5 mM TES, 1 mM BSA; pH 7.4) and protein concentration was determined with the Bicinchoninic acid reagent (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Scientific) using BSA as standard. Mitochondria were centrifuged at 16,000g for 5min and the pelleted mitochondria were resuspended in 0.6N HCl, homogenized and sonicated for 5min. Mitochondria were incubated in a dry water bath at 100°C and mitochondrial lysates were centrifuged at 10000g for 5min. Supernatants were recovered and their pH was adjusted to 7. Calcium content in the supernatants was determined spectrophotometrically using the o-Cresolphthalein Complexone method (Cayman Chemical, 701220). Results were expressed in nanomoles of Ca<sup>2+</sup> per milligram of protein.

**Western blotting**

Western blotting was performed as previously described (5). Mitochondrial subfractions were isolated from ex vivo perfused hearts submitted to IR in NG (11mM) or HG (33mM) KH buffer. Mitochondrial and cytosolic proteins were separated on polyacrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked and incubated at 4°C with primary antibodies against dynamin-like protein 1 (DRP1) (1:1000, Cell Signaling), DRP1 phosphorylated on S616 (DRP1P-S616) (1:500, Cell Signaling), DRP1 phosphorylated on S637 (DRP1P-S637) (1:1000, Cell Signaling), voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1) (1:30000, Cell Signaling) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:3000 Santa Cruz). The corresponding HRP-conjugated IgG (secondary



antibodies) were used according to standard procedures. Immunodetection was carried out using the ECL chemiluminescence system (VILBER Fusion FX).

### **Transmission electron microscopy**

After ex vivo IR, LV samples from NG- and HG-perfused hearts were washed and fixed in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1M) at room temperature for 2h and then at 4°C overnight. After rinsing, samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1h, dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in resin. Ultrathin sections of heart tissues were prepared with a diamond knife in a Reichert Ultracut E ultramicrotome and stained with uranyl acetate and lead citrate. Images were acquired with a transmission electron microscope (TEM Hitachi H7800) by randomly selecting longitudinally-arranged cardiomyocytes. Mitochondrial area and aspect ratio, which reflects the “length to width ratio”, were quantified by manual measurements using the ImageJ software, excluding swollen mitochondria. Mitochondria-SR distance and interactions were measured manually using the Image J software. More than 600 mitochondria from at least 3 independent hearts per condition were analyzed.

### **Proteomics**

Cardiac mitochondria were isolated as previously described (2) from hearts perfused with NG (11mM) or HG (33mM) KH buffer and submitted to ex vivo IR. Heart homogenates were centrifuged at 1,000 g, 4°C, for 10min. Supernatants were collected and centrifuged at 12,000 g, 4°C, for 15min. Pellets were collected (mitochondrial fraction). Mitochondrial proteins were extracted by resuspending the mitochondrial pellets in HENS buffer (100mM Hepes, 1mM EDTA, 0.1mM Neocuproine, 1% SDS, 100mM NEM; pH 6), followed by three freeze/thaw cycles in liquid nitrogen and vigorous vortexing. Undissolved lipid fragments were collected by centrifugation at 10,000g, 4 °C, for 10min. Supernatants were collected and protein concentration was determined with the Bicinchoninic acid reagent (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific) using BSA as standard.

*Sample preparation:* Protein samples were diluted to 1.25 µg/µL in 4X NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 50mM/LDS buffer (3/1) and heated at 99°C for 5min. For each sample, a 25-µg protein aliquot was loaded onto a NUPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Thermo Fisher Scientific) for a 6min electrophoretic migration at 200V in 1X MES/SDS running buffer. After gel staining with Simply Blue Safestain, each band corresponding to the whole soluble proteome was recovered and processed for in-gel trypsin digestion as previously described (6,7). Gel pieces were reduced with dithiothreitol and the resulting thiol groups were alkylated with iodoacetamide. In-gel proteolysis was then carried out at 50°C with Trypsin Gold (Promega) in the presence of 0.01% ProteaseMAX detergent (Promega) for 1h. The reaction was stopped by addition of trifluoroacetic acid (0.5M final concentration).

*Nano-LC tandem MS measurements:* Tryptic peptides were identified using a Q-Exactive™ HF tandem mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Ultimate 3000 chromatography system (Thermo Fisher Scientific). High-resolution tandem mass spectrometry (MS) was performed in the data-dependent acquisition mode as previously described (8). Briefly, each sample digest (10µL) was desalted online on a 5 mm reverse phase capillary Acclaim™ PepMap™100 C18 precolumn (300 µm inner diameter, 100-Å pore size, 5µm bead size, Thermo Fisher Scientific) and peptides were then resolved on a 50 cm Acclaim™ PepMap™ 100 C18 column (75 µm inner diameter, 100Å pore size, 2µM bead size, Thermo Fisher Scientific) using a 90min gradient of 4% to 20% acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) in 0.1% formic acid for 75min and then 20% to 32% for 15min at 0.3 µL.min<sup>-1</sup> flow rate. Full-scan mass spectra of the separated peptides were recorded from 350 to 1500 m/z with a resolution of 60,000. After each scan, the 20 most intense 2+ - 3+ charged ions were selected for fragmentation through higher-energy c-trap dissociation with a normalized collision energy of 27%. The MS/MS spectra of fragments were acquired at an isolation width of 2 m/z and at 15,000 resolution using an AGC target value of  $1 \times 10^5$  with a maximum injection time of 60ms. An intensity threshold of  $8.3 \times 10^4$  was applied and once fragmented, peaks were dynamically excluded from precursor selection for 10 s.

*MS/MS spectra interpretation:* The raw files generated by the Q-Exactive HF mass spectrometer were analyzed with the Proteome Discoverer v1.3 software (Thermo Fisher Scientific). Peak lists were automatically generated with the extract\_msn.exe data import filter (Thermo Fisher Scientific) from the Xcalibur FT package (version 2.0.7; Thermo Fisher Scientific). MS/MS spectra were queried against the Rattus norvegicus reference protein sequence database (25,738 protein entries and 15,592,510 amino acid residues; downloaded from NCBI on November 1, 2019) with the Mascot Daemon software (version 2.6.1 Matrix Science). The following parameters were used for the search: trypsin as enzyme, maximum of two missed cleavages, mass tolerance of 5 ppm on the precursor ion and of 0.02 Da on the secondary ion, variable modifications of N-ethylmaleimide (C), Carbamidomethyl (C), Oxidation (M), Deamidation (NQ).

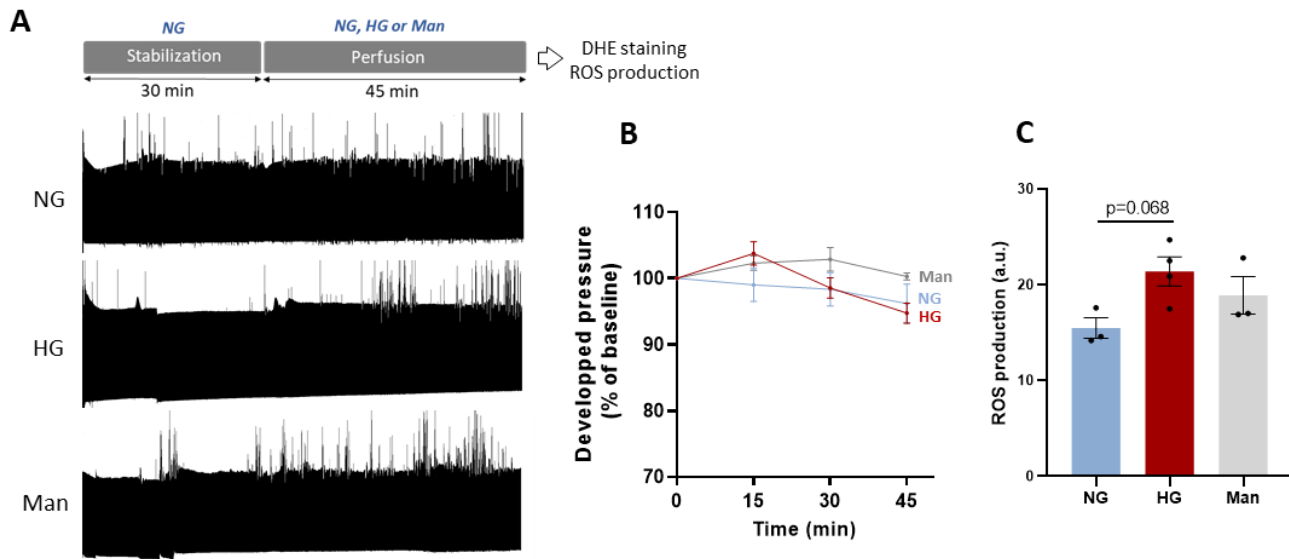
*Protein identification and label-free quantification:* All peptide matches with a MASCOT peptide score below the p-value of 0.05 were filtered and assigned to a protein according to the principle of parsimony. Only proteins with at least two peptides were considered in the study. Peptide-to-Spectrum Matches were counted for each protein for label-free quantification (Spectral Counting, spectral counts, SC). Protein abundance between groups was compared with the T-Fold test (9) and the t-test considering samples with unequal variance and bilateral repartition.

### Statistical analyses

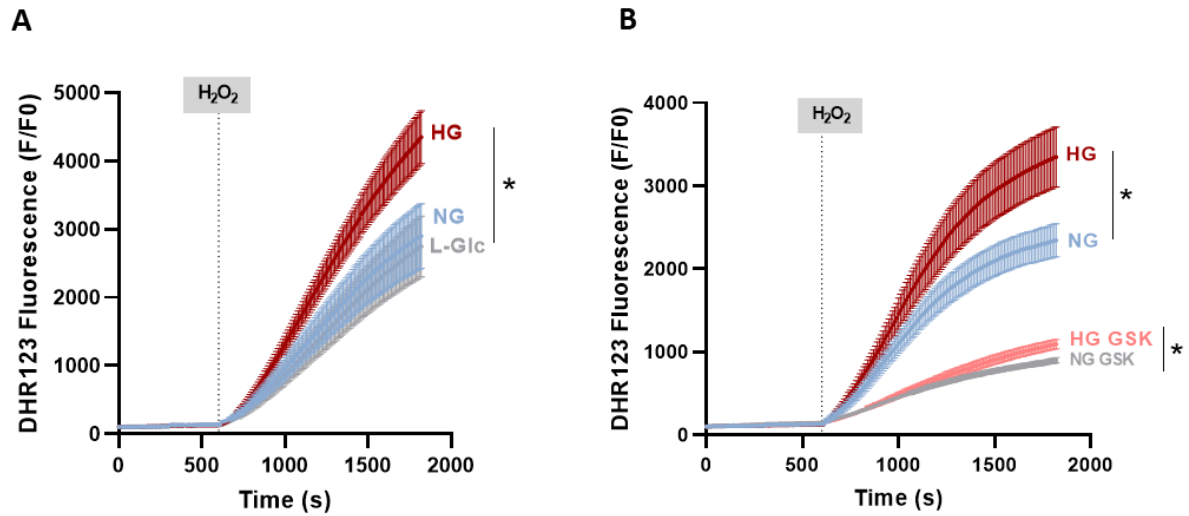
Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM or as median and interquartile range for the violin plots. Experimental conditions were compared with the Student's t-test, analysis of variance (ANOVA), or repeated-measures ANOVA followed by the Turkey's multiple comparisons test when data were normally distributed (confirmed by the Shapiro–Wilk normality test). When necessary, non-parametric tests were used (Mann–Whitney test for two groups). A p value  $<0.05$  was considered significant. Statistical analyses were done with GraphPad Prism (8.4.3).

### REFERENCES

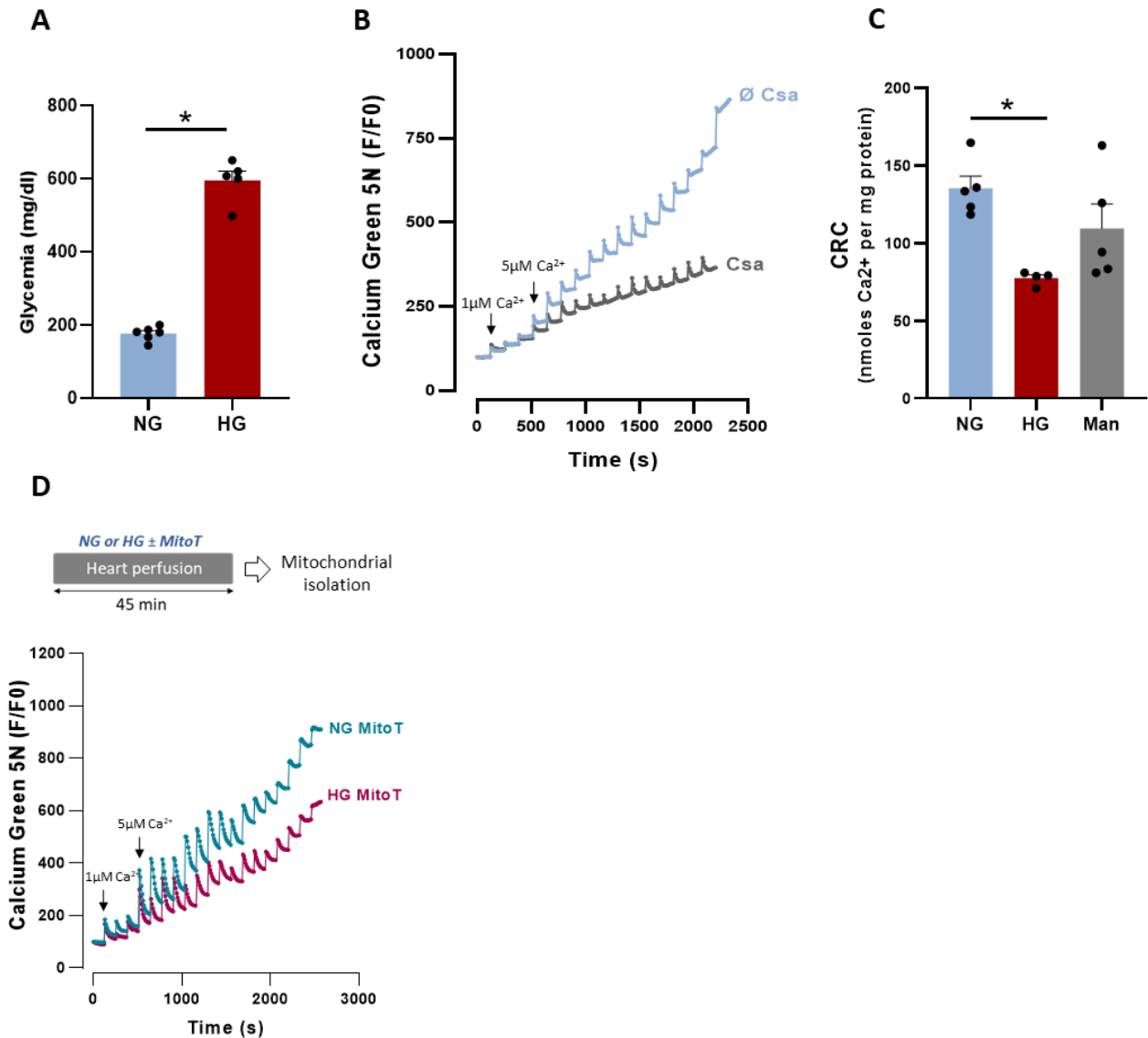
1. Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, et al. Exercise does not activate the  $\beta_3$  adrenergic receptor–eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res Cardiol.* 2016 Jul;111(4):40.
2. Boulghobra D, Grillet PE, Laguerre M, Tenon M, Fauconnier J, Faça-Berthon P, et al. Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes. *Redox Biol.* 2020 Jul 1;34:101554.
3. Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayrard S, Geny B, et al. Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res Cardiol.* 2013 Oct 9;108(6):389.
4. Cazorla O, Szilagy S, Le Guennec JY, Vassort G, Lacampagne A. Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J.* 2005;19(1):88–90.
5. Boulghobra D, Dubois M, Alpha-Bazin B, Coste F, Olmos M, Gayrard S, et al. Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2021 Dec 23;116(1):66.
6. Hartmann EM, Allain F, Gaillard JC, Pible O, Armengaud J. Taking the Shortcut for High-Throughput Shotgun Proteomic Analysis of Bacteria. In: Vergunst AC, O'Callaghan D, editors. *Host-Bacteria Interactions: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer; 2014 [cited 2023 Aug 22]. p. 275–85. (Methods in Molecular Biology). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1261-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1261-2_16)
7. Clair G, Armengaud J, Duport C. Restricting Fermentative Potential by Proteome Remodeling. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Jun;11(6):M111.013102.
8. Klein G, Mathé C, Biola-Clier M, Devineau S, Drouineau E, Hatem E, et al. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. *Nanotoxicology.* 2016 Nov 25;10(10):1555–64.
9. Carvalho PC, Yates JR, Barbosa VC. Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics.* 2012 Jun 15;28(12):1652–4.



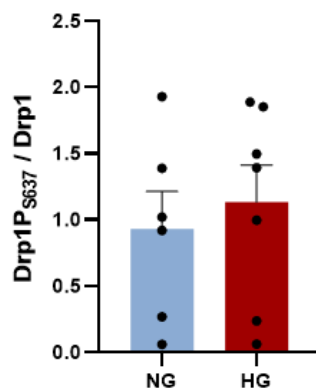
**Figure S1:** (A) Schematic illustration of the experimental protocol and representative traces of left ventricular (LV) pressure recording throughout perfusion in isolated hearts perfused with normoglycemic (NG; 11mM), hyperglycemic (HG; 33mM) or mannitol (Man; 22mM mannitol + 11 mM glucose; osmotic control) buffer. After a stabilization period (30min) in NG buffer, hearts were perfused in NG, HG or Man buffer for 45min. (B) LV developed pressure during 45min of perfusion in NG, HG or Man buffer (N=5-8 hearts/group). Values were normalized to the baseline level. (C) ROS production assessed in heart slices stained with DHE (10 $\mu$ M) after 45min of heart perfusion in NG, HG or Man buffer (N=3-4 hearts/group;  $p=0.068$  NG vs. HG; one-way ANOVA).



**Figure S2: (A-B)** Cardiomyocytes isolated from 4-5 independent hearts/group were loaded with the ROS-sensitive fluorescent probe dihydrorhodamine 123 (DHR123; 5 $\mu$ M) and then incubated in NG (6mM), HG (33mM) or osmotic control (11mM D-glucose + 22mM L-glucose; L-Glc) buffer (**A**). Some cardiomyocytes were incubated with the NOX2-specific inhibitor GSK-2795039 (GSK; 25 $\mu$ M) (**B**). Fluorescence intensity was measured every 10s and normalized to baseline fluorescence (F/F<sub>0</sub>). Cardiomyocytes were stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 $\mu$ M) to mimic IR-induced oxidative stress (\**p* < 0.05 NG vs. HG; repeated two-way ANOVA).

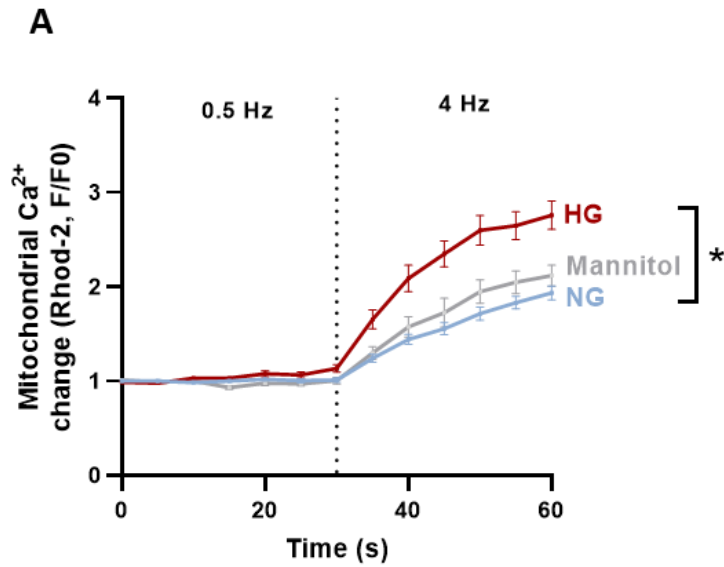


**Figure S3:** (A) Blood glucose levels in rats 48h after injection of vehicle (citrate buffer; NG group) or streptozotocin (STZ; 40mg/kg; HG) (N=5-6 rats/group; \*p < 0.05 NG vs. HG; parametric t-test). (B) Mean traces of the Ca<sup>2+</sup> retention capacity (CRC) test in isolated cardiac mitochondria, incubated or not with cyclosporine A (CsA; 2 μM), used as mPTP inhibitor (n= 10 experiments from N=3 hearts/group). CRC was monitored using the Ca<sup>2+</sup> Green-5N probe (1 μM). Each peak corresponds to Ca<sup>2+</sup> addition (3 CaCl<sub>2</sub> pulses at 1 μM followed by pulses at 5 μM; changes in concentration are represented by black arrows). (C) Quantification of CRC (nmol Ca<sup>2+</sup> per mg protein) in mitochondria isolated from hearts perfused with NG (11mM), HG (33mM) or mannitol (Man; osmotic control; 22mM mannitol + 11 mM glucose) for 45min (N=4-5 hearts/group; \*p < 0.05 NG vs. HG; one-way ANOVA). (D) Mean traces of the CRC test in mitochondria isolated from hearts perfused with NG (11mM; n=23 experiments from N=5 independent hearts) or HG (33mM; n=19 experiments from N=4 independent hearts) buffer for 45min, with MitoTEMPO (MitoT; 1 μM; 8 experiments from n=2 hearts).

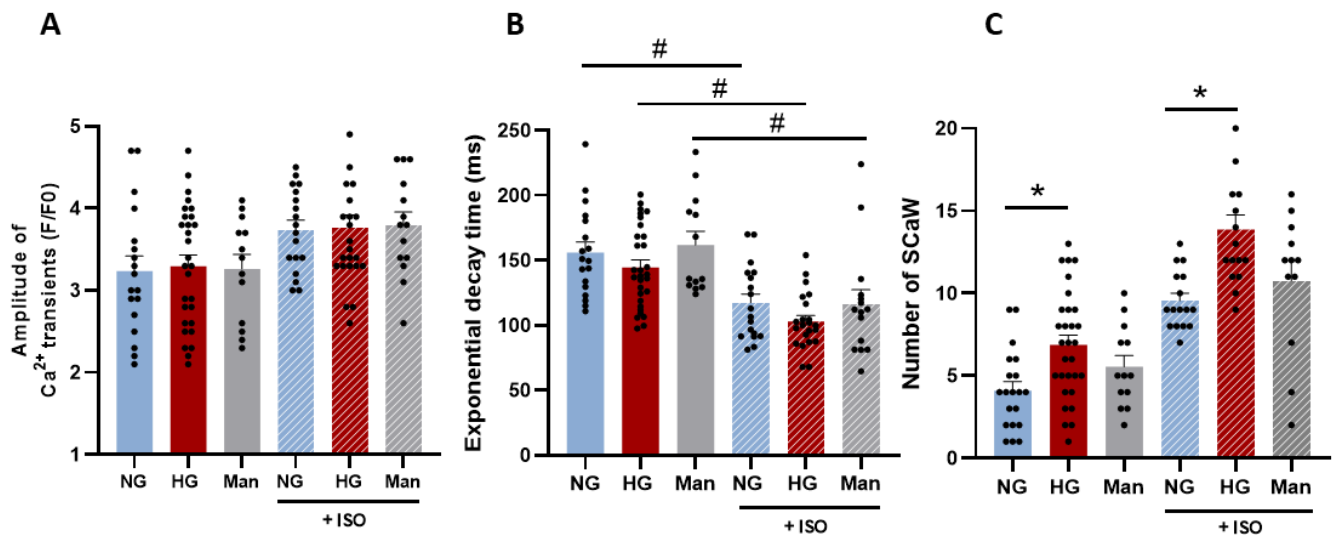
**A**

**Figure S4: (A)** DRP1 phosphorylated on S637 (inhibitory site) relative to total DRP1 expression in mitochondrial subfractions from NG (n=6 hearts in duplicate) and HG (n=7 hearts in duplicate) perfused hearts after IR (\* $p < 0.05$  NG vs. HG; parametric t-test).





**Figure S5:** (A) Mean traces of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat cardiomyocytes, loaded with Rhod-2 ( $5\mu\text{M}$ ) and incubated in NG (6mM), HG (33mM) or mannitol (22mM mannitol + 11 mM glucose) buffer for 45min. Cardiomyocytes were paced (19V) at 0.5Hz (30s) and 4Hz (30s) to stimulate excitation-contraction coupling and the mitochondrial accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$ . Fluorescence was measured every 5s for 60s and was normalized to the baseline fluorescence ( $F_0$ ) ( $n\approx 23$ -28 cells per condition from  $N=3$  independent hearts). (\* $p < 0.05$  NG vs. HG; repeated two-way ANOVA).



**Figure S6:** Quantification of the amplitude of Ca<sup>2+</sup> transients (A), the exponential decay time Tau (B) and the number of spontaneous Ca<sup>2+</sup> waves (SCaW) (C) in isolated cardiomyocytes loaded with the intracellular Ca<sup>2+</sup> indicator Fluo-4 AM (10μM) and incubated with NG (6mM), HG (33mM) or mannitol (Man; osmotic control; 22mM mannitol + 11 mM glucose) buffer for 45min. Cardiomyocytes were stimulated or not with isoproterenol (ISO; 1μM) (n=15-30 cells per condition from 3-6 independent hearts; \*p <0.05 NG vs. HG, #p <0.05 ISO effect; two-way ANOVA).



## DISCUSSION

## I. Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents expliquant les effets délétères de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR. Nous avons dans un premier temps mis en évidence le rôle de l'interaction complexe entre dynamique mitochondriale, homéostasie calcique et production d'ERO dans la vulnérabilité accrue du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie. Dans un second temps, nous avons rapporté que l'utilisation d'un inhibiteur de Drp1, le Mdivi-1, permet de prévenir la surproduction d'ERO, les désordres de l'homéostasie calcique et de réduire les lésions d'IR suggérant un rôle clé de Drp1 dans les effets délétères de l'hyperglycémie au cours de l'IR.

Afin de ne pas être redondant avec la discussion de l'article, nous discuterons essentiellement dans cette partie des arguments en faveur de l'idée que l'hyperglycémie agit comme un préconditionnant négatif cellulaire, favorisant la vulnérabilité des mitochondries à une situation de stress telle que l'IR.

Comme décrit dans la revue de littérature (Chapitre 2/II.2), l'hyperglycémie *per se* est apparue ces dernières années comme un facteur prédictif de la sévérité des lésions cardiaques suite à un infarctus du myocarde (Penna et al., 2020); néanmoins il est aujourd'hui difficile d'expliquer si la sévérité de l'infarctus va déterminer le niveau d'hyperglycémie et ainsi expliquer cette relation ou si l'hyperglycémie avant ou au cours de l'infarctus est à l'origine d'une glucotoxicité cellulaire contribuant à l'exacerbation de la sensibilité du cœur à l'IR. Il est tout d'abord intéressant de noter que plusieurs études cliniques ont rapporté que la consommation excessive de boissons riches en sucre est associée à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire (Ma et al., 2023). Ainsi, le risque d'infarctus du myocarde est 25% plus élevé chez les femmes consommant plus de 1,5 tasses ( $\approx 350\text{mL}$ ) de boissons sucrées par jour par rapport à celles qui n'en consomment rarement/jamais (Pacheco et al., 2020). Ces études suggèrent qu'indépendamment du diabète, la récurrence d'excursions glycémiques (i.e. élévation de la glycémie au-delà de la valeur basale) au cours de la vie d'un individu pourrait impacter négativement son pronostic cardiovasculaire. Néanmoins, à ce jour l'impact de ces variations de la glycémie sur la vulnérabilité du cœur à un épisode d'ischémie demeure non investigué. Seul des travaux expérimentaux sur des modèles cellulaires ou animaux, ont pu montrer que l'augmentation transitoire de la glycémie via une injection de dextrose sur rat ou souris augmente la vulnérabilité du cœur à l'IR (Ham et al., 2019; Yang et al., 2009). En adéquation avec ces résultats, nous avons rapporté que l'hyperglycémie *per se*, sur cœur isolé perfusé ou *in vivo* 48h après une injection de

streptozotocine chez le rat, diminue la récupération fonctionnelle cardiaque post-IR et augmente la taille de la zone infarctée. Ces résultats suggèrent que l'hyperglycémie, indépendamment des complications liées au diabète, participe à l'augmentation de la sensibilité du cœur à l'IR. Parmi les mécanismes sous-jacents pouvant expliquer les effets délétères de l'hyperglycémie, la surproduction d'ERO cellulaires a été bien décrite dans la littérature (Battault et al., 2020; Lu et al., 2020; Sedlic et al., 2017). Dans notre étude, nous avons rapporté une production accrue d'ERO en condition d'hyperglycémie, à la fois sur tissu cardiaque post-IR ex vivo ainsi que sur cardiomyocytes isolés et mitochondries isolées lors d'une condition mimant un stress oxydatif de reperfusion. Contrairement à d'autres études (Lu et al., 2020), nous avons observé que la surproduction d'ERO en hyperglycémie implique à la fois NOX2 et la mitochondrie. De manière intéressante, des études sur des modèles murins diabétiques ou sur cardiomyocytes incubés 24h en hyperglycémie ont rapporté un impact de la NOX2 sur la production d'EROMt, probablement via un phénomène de « ROS-induced-ROS release » (Ni et al., 2016; Shen et al., 2009). Ainsi, nous pouvons supposer que la production d'ERO par NOX2 pourrait participer aux dysfonctions mitochondriales et ainsi favoriser la production d'EROMt (voir Chapitre 2/II.2.a). En accord avec cette hypothèse, nous avons rapporté, dans le cadre d'expérimentations annexes, que l'augmentation de la sensibilité des mitochondries à un stress calcique (i.e. capacité de rétention calcique), en condition d'hyperglycémie, était prévenue par la perfusion des cœurs isolés avec de l'apocynine, inhibiteur des NOX, (données non présentées dans ce manuscrit). Les mêmes résultats sont observés lors de l'utilisation de Mitotempo, suggérant l'implication d'un phénomène de *ROS-induced ROS release*. Ainsi, ces résultats mettent en avant un rôle potentiel de l'interaction NOX2-mitochondrie dans les dysfonctions mitochondriales observées en condition d'hyperglycémie. Par ailleurs, la surproduction d'ERO cellulaires étant observée sur tissu cardiaque dès 45 minutes de perfusion en hyperglycémie (i.e. sans IR), nous pouvons conclure, en accord avec les données de la littérature (Lu et al., 2020; Sedlic et al., 2017; Van Steenberghe et al., 2017) que l'hyperglycémie est suffisante pour induire un stress oxydant cardiaque. Celui-ci pourrait constituer le premier élément clé, expliquant la suite des désordres cellulaires en réponse à l'hyperglycémie.

Ainsi, au-delà de la surproduction d'ERO, la glucotoxicité cardiaque semble également pouvoir être expliquée par des désordres au niveau de l'homéostasie calcique cellulaire et mitochondriale. En effet, nous avons rapporté, en accord avec Lu et al. (2020), que l'incubation des cardiomyocytes en hyperglycémie entraîne une augmentation des vagues calciques spontanées, témoignant d'une hyperactivation du RyR2. De manière intéressante, ce phénomène est prévenu par l'utilisation de Mitotempo, suggérant un rôle majeur des EROmt dans les troubles de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire médiés par l'hyperglycémie. L'existence d'un cercle vicieux entre production

d'EROMt et désordres de l'homéostasie calcique cellulaire a déjà été décrit sur cardiomyocytes isolés incubés en normoglycémie, suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique (Hamilton et al., 2020). En effet, les auteurs ont rapporté que les EROmt en oxydant le RyR2 augmentent les fuites calciques incontrôlées du RS, qui à leur tour accentuent la surcharge calcique mitochondriale et la production d'EROMt (Hamilton et al., 2020). Dans une autre étude (Hamilton et al., 2021), le même groupe a pu montrer que la stimulation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie (par surexpression du MCU) est à l'origine d'une surproduction d'EROMt associée à une augmentation des vagues calciques sur cardiomyocytes isolés. Ainsi, il semblerait que l'oxydation de RyR2 puisse expliquer l'installation d'un cercle vicieux entre production d'EROMt et altérations de l'homéostasie calcique en réponse à une situation d'hyperglycémie. Il serait dès lors intéressant d'évaluer le niveau d'oxydation de RyR2 dans nos conditions expérimentales. Pour répondre à cette question nous avons mis en place une analyse des modifications redox de nos protéomes post-ischémie-reperfusion, basée sur le blocage des cystéines non oxydées avec du NEM (N-Ethylmaleimide) et la mesure de modifications redox par spectrométrie de masse. Les résultats n'ont pour le moment pas pu être interprétés et ne sont donc pas présentés dans ce manuscrit. Nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que les EROmt pourraient favoriser la phosphorylation de RyR2, en activant des kinases telles que la CAMKII, dont l'activité est augmentée en condition d'hyperglycémie (Lu et al., 2020) et en réponse à la production d'ERO (Erickson et al., 2008)

Dans notre modèle, nous observons des troubles de l'homéostasie calcique à l'échelle de la mitochondrie isolée, du cardiomyocyte ou encore sur cœur isolé pendant l'ischémie-reperfusion. Ces désordres de l'homéostasie calcique cellulaire sont associés, dans nos modèles, à des altérations de l'homéostasie calcique mitochondriale, caractérisées par une augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à une situation de stress. Ces résultats sont en désaccord avec les travaux rapportant une diminution de l'expression du MCU et de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  dans des modèles murins de diabète ou sur cardiomyocytes suite à une hyperglycémie chronique (Diaz-Juarez et al., 2016; Suarez et al., 2018). Ces divergences pourraient suggérer que la durée d'exposition au stress hyperglycémique pourrait aboutir à des adaptations différentes de l'homéostasie calcique mitochondriale. L'hyperglycémie aiguë transitoire induirait une stimulation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Avec le temps, les cellules s'adaptent à ce stress en limitant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie. Dans notre étude, nous pouvons supposer que l'augmentation des fuites calciques du RyR2 en réponse à l'hyperglycémie puisse « pré-activer » le MCU, le rendant plus sensible lors d'une stimulation calcique ultérieure. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi, lorsque les mitochondries sont isolées de cœur hyperglycémiques (isolé perfusé ou rats traités à la STZ), l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via le MCU est plus rapide. Par ailleurs, Garcia-Pérez et al. (2008) ont observé, sur des fractions brutes ou purifiées de mitochondries isolées à partir de cœur, la présence de



particules de RS contenant RyR2, associées aux mitochondries isolées. De manière intéressante, la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RyR2, stimulée par l'ajout de caféine, est à l'origine d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  sans impact sur la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans le tampon (García-Pérez et al., 2008). Ces résultats suggèrent un transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  très localisé entre les particules du réticulum et les mitochondries. Dans notre étude, nous avons observé par analyse protéomique, une augmentation de la quantité relative de la protéine RyR2 dans les fractions mitochondriales, suggérant potentiellement une augmentation de ces particules de RS et de leurs interactions avec les mitochondries. Ceci pourrait aussi contribuer à expliquer l'augmentation d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries isolées issues de cœur hyperglycémiques. Ces hypothèses méritent néanmoins d'être vérifiées. Bien que l'impact direct ou indirect de l'hyperglycémie sur la stabilité du RyR2 puisse expliquer nos résultats, nous ne pouvons pas exclure des modifications de la probabilité d'ouverture du MCU. En effet, il a été rapporté que l'oxydation du MCU par les EROmt ainsi que sa phosphorylation par la CAMKII conduit à une augmentation marquée de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie (Dong et al., 2017; Joiner et al., 2012). Ces modifications post-traductionnelles pourraient aussi expliquer l'augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  observées sur les mitochondries isolées à partir des cœurs perfusés en hyperglycémie. Ces différentes modifications, pouvant toucher aussi bien le RyR2 que le MCU pourraient contribuer à favoriser les échanges de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le réticulum et la mitochondrie au cours de l'IR et ainsi à rendre le cœur plus vulnérable.

Ainsi, l'hyperglycémie *per se* semble être à l'origine d'un cercle vicieux entre surproduction d'ERO et troubles de l'homéostasie calcique, qui au cours de l'IR accroît la sensibilité des mitochondries au stress et conduit à l'ouverture précoce du mPTP. Ainsi, l'hyperglycémie agirait comme un préconditionnant négatif rendant plus vulnérables les mitochondries lors d'un stress ultérieur.

Par ailleurs, dans notre travail, un pré-traitement avec du Mdivi-1, 24h et 1h avant l'ischémie ne permet pas d'induire une cardioprotection chez les animaux normoglycémiques. Alors que le pré-traitement avec cet inhibiteur de DRP1 juste avant une IR ou au cours de la reperfusion, permet de réduire sensiblement la sévérité des lésions d'IR (Ong et al., 2010; Sharp et al., 2014). De manière intéressante, cette stratégie de cardioprotection (pré-traitement avec du Mdivi-1 24h et 1h avant l'ischémie) chez les rats hyperglycémiques (streptozotocine) permet de prévenir des lésions d'IR. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de Drp1 à distance de l'IR, exerce un effet protecteur en limitant les dysfonctions cellulaires (i.e. entrée accrue de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie, ouverture du mPTP) induits par l'hyperglycémie *per se*, avant l'IR.

## II. Limites de l'étude

Dans cette étude, nous avons utilisé le Mdivi1, un inhibiteur allostérique bien décrit de Drp1. Son interaction avec cette protéine demeure néanmoins mal comprise. Il a été proposé que le Mdivi1 inhibe l'activité GTPase de Drp1 et ainsi son auto-assemblage néanmoins cela reste controversé (Bordt et al., 2017; Cassidy-Stone et al., 2008). Par ailleurs, bien que le Mdivi-1 demeure l'inhibiteur de Drp1 le plus couramment utilisé dans la littérature scientifique, sa spécificité a été remise en cause dans plusieurs études récentes (Bordt et al., 2017, 2022; Ruiz et al., 2018). Pourtant, si l'on considère les nombreux rôles non-canoniques de Drp1 (indépendant de la fission mitochondriale), notamment sur l'interaction entre les mitochondries et le réticulum (Adachi et al., 2020), l'activation du mPTP (Zhang et al., 2017), l'apoptose (Jenner et al., 2022) ou encore la mitophagie (Tong et al., 2023), il semble aujourd'hui difficile de déterminer si ces effets non spécifiques rapportés, sont le résultat d'effets non ciblés du Mdivi-1 ou du rôle cellulaire pléiotropique de Drp1. Par ailleurs, il existe d'autres inhibiteurs de Drp1 tels que le P110, un peptide qui inhibe spécifiquement l'interaction entre Drp1 et son récepteur Fis1. L'utilisation de cet inhibiteur dans notre étude aurait pu être pertinente puisque P110 est rapporté comme permettant d'inhiber plus spécifiquement la fission pathologique dépendante de Fis1 sans impact sur la fission adaptative et physiologique (Qi et al., 2013). Néanmoins, il est intéressant de noter que l'injection de Mdivi-1 ou de P110 avant une IR ex vivo et in vivo induit des effets protecteurs comparables (Disatnik et al., 2013; Ong et al., 2010; Sharp et al., 2014). L'utilisation d'animaux partiellement délétés ou avec une délétion cardiaque de Drp1 aurait pu permettre de mieux comprendre le rôle clé de cette protéine dans la glucotoxicité. Néanmoins, ces modèles de souris sont généralement associés à une forte mortalité et/ou un remodelage cardiaque sévère.

Pour finir, une autre limite importante de ce travail est que nous n'avons pas pu vérifier l'impact du pré-traitement au Mdivi-1 sur la fission mitochondriale et l'interaction mitochondrie-réticulum au cours de l'ischémie-reperfusion. Ces résultats auraient permis de confirmer le rôle de Drp1 sur le remodelage de la dynamique mitochondriale en réponse à un stress d'hyperglycémie.

### III. Conclusion générale

En conclusion, l'ensemble de ce travail de thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes cellulaires associés à la glucotoxicité cardiaque, permettant, au moins en partie d'expliquer la vulnérabilité accrue du cœur à l'ischémie-reperfusion en condition d'hyperglycémie. Ces travaux ont pour la première fois fait apparaître que le stress hyperglycémique, associé à une situation de stress majeur telle que l'ischémie-reperfusion, peut conduire à un remodelage rapide du réseau mitochondrial et de son interaction avec le réticulum. Ce phénomène semble pouvoir contribuer aux désordres de l'homéostasie calcique mitochondriale, à la surproduction d'EROmt et finalement à l'activation précoce du mPTP. Ces résultats ont ainsi permis de mettre en avant l'intérêt de pouvoir cibler les atteintes de la dynamique mitochondriale au cours de l'hyperglycémie afin de tenter d'en limiter les effets délétères et ainsi de moduler la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion. L'activation de la protéine Drp1, élément clé de la fission mitochondriale, mais qui semble aussi pouvoir jouer un rôle non négligeable dans les interactions reticulum-mitochondrie, est apparue comme un acteur majeur de ces phénomènes. En effet, nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de Drp1 avec du Mdivi1 au cours de la phase d'hyperglycémie, permet de réduire la production d'ERO, de limiter les troubles de l'homéostasie calcique, de retarder l'activation du mPTP et finalement de limiter la sévérité des lésions d'ischémie-reperfusion. Ainsi, ces travaux ont permis d'apporter un nouveau regard sur la glucotoxicité cardiaque et de mettre en avant une cible thérapeutique potentielle.



## ARTICLES ANNEXES

## Article annexe n°1

---

Au cours de ma deuxième année de thèse au sein du Laboratoire de Physiologie Expérimentale Cardiovasculaire, j'ai été amené à conduire des expérimentations permettant de compléter l'article de thèse de Doria Boulghobra et ainsi de répondre aux remarques des experts du journal *Basic Research in Cardiology*. En effet, à ce moment, Doria Boulghobra avait quitté le laboratoire pour un contrat postdoctoral. Après discussion avec l'équipe en charge de ce projet, nous avons décidé que je réaliserai les expérimentations complémentaires, c'est-à-dire les IR in vivo chez le rat, des Western Blot sur cardiomyocytes isolés et des marquages histologiques. Ces données complémentaires ont permis à ce travail d'être accepté pour publication dans ce journal.

Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection. Boulghobra D, **Dubois M**, Alpha-Bazin B, Coste F, Olmos M, Gayrard S, Bornard I, Meyer G, Gaillard JC, Armengaud J, Reboul C. *Basic Res Cardiol*. 2021 Dec 23;116(1):66. doi: 10.1007/s00395-021-00906-3

### **Contexte scientifique et hypothèse :**

Plusieurs études récentes ont rapporté que l'activation de la eNOS (endothelial nitric oxide synthase ; enzyme produisant le NO) par l'exercice physique joue un rôle clé dans la diminution de la sensibilité du cœur à l'IR (Calvert et al., 2011; Farah et al., 2013). Par ailleurs, la biodisponibilité du NO au niveau mitochondrial semble jouer un rôle clé dans plusieurs stratégies de cardioprotection, en limitant la production d'ERO et l'activation du mPTP (Borutaite & Brown, 2006; Burwell et al., 2006). Néanmoins, à ce jour, l'impact de l'exercice physique sur la signalisation eNOS/NO au niveau mitochondrial reste à investiguer. Ainsi, l'hypothèse de ce travail était que la cardioprotection induite par l'exercice puisse être expliquée, au moins en partie, par un ciblage de la mitochondrie par la voie eNOS/NO.

### **Résultats majeurs :**

Ces travaux ont permis de montrer que l'exercice physique est à l'origine d'une translocation de la eNOS vers les mitochondries, augmentant ainsi 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.



## Increased protein S-nitrosylation in 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> · Maxime Olmos<sup>1</sup> · Sandrine Gayraud<sup>1</sup> · Isabelle Bornard<sup>3</sup> · Gregory Meyer<sup>1</sup> · Jean-Charles Gaillard<sup>2</sup> · Jean Armengaud<sup>2</sup> · Cyril Reboul<sup>1,4</sup>

Received: 25 January 2021 / Revised: 16 December 2021 / Accepted: 17 December 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany 2021

### Abstract

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation in the heart plays a key role in exercise-induced cardioprotection during ischemia–reperfusion, but the underlying mechanisms remain unknown. We hypothesized that the cardioprotective effect of exercise training could be explained by the re-localization of eNOS-dependent nitric oxide (NO)/S-nitrosylation signaling to mitochondria. By comparing exercised (5 days/week for 5 weeks) and sedentary Wistar rats, we found that exercise training increased eNOS level and activation by phosphorylation (at serine 1177) in mitochondria, but not in the cytosolic subfraction of cardiomyocytes. Using confocal microscopy, we confirmed that NO production in mitochondria was increased in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure in cardiomyocytes from exercised but not sedentary rats. Moreover, by S-nitrosoproteomic analysis, we identified several key S-nitrosylated proteins involved in mitochondrial function and cardioprotection. In agreement, we also observed that the increase in Ca<sup>2+</sup> retention capacity by mitochondria isolated from the heart of exercised rats was abolished by exposure to the NOS inhibitor L-NAME or to the reducing agent ascorbate, known to denitrosylate proteins. Pre-incubation with ascorbate or L-NAME also increased mitochondrial reactive oxygen species production in cardiomyocytes from exercised but not from sedentary animals. We confirmed these results using isolated hearts perfused with L-NAME before ischemia–reperfusion. Altogether, these results strongly support the hypothesis that exercise training increases eNOS/NO/S-nitrosylation signaling in mitochondria, which might represent a key mechanism of exercise-induced cardioprotection.

**Keywords** Nitric oxide · S-Nitrosylation · Ischemia–reperfusion · mPTP

### Introduction

Ischemic heart disease remains one of the main causes of morbidity and mortality worldwide [66]. In animal models, many strategies, such as ischemic pre- and post-conditioning and pharmacological conditioning, are used to efficiently protect the heart during ischemia–reperfusion (IR). Although, most of them remain poorly transferable or effective in humans, exercise training has beneficial effects in rodent [23, 33] and also human [21, 47] hearts during IR through not yet fully understood mechanisms. Recently, we [23] and others [10] reported that activation of the endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide (eNOS/NO) pathway by exercise training strongly contributes to heart protection. This cardioprotective effect is lost when eNOS is pharmacologically inhibited [23] or the encoding gene is ablated [10]. Initially, much of NO cardioprotection was attributed

✉ Cyril Reboul  
cyril.reboul@univ-avignon.fr

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

<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France

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

<sup>4</sup> Cardiovascular Physiology Laboratory, UPR4278, UFR Sciences Technologies Santé, Centre INRAE-Site Agroparc, 228 route de l'Aérodrome, 84914 Avignon Cedex 9, France



to activation of guanylyl cyclase that results in the production of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and activation of protein kinase G (PKG) [17, 18]. In the last decade, protein *S*-nitrosylation (SNO), defined as the binding of one NO moiety to a thiol group of a cysteine residue [59], has emerged as an important modulator of cardiovascular functions [42, 69], and a possible key mechanism in NO-mediated cardioprotection [34, 35, 73].

Mitochondria are considered key triggers of post-ischemic reperfusion injuries. Indeed, post-ischemic reperfusion leads to mitochondria-driven injuries explained by excessive production of reactive oxygen species (ROS) and dysregulation of calcium handling. Both lead to mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening that results in abnormal permeation, swelling and disruption of mitochondrial membranes, and release of pro-apoptotic factors [41]. In the last decade, mitochondria have emerged as a key target of cardioprotective strategies (i.e., ischemic pre- and post-conditioning) [5, 30]. Interestingly, NO is a strong regulator of mitochondrial function [22] and the eNOS/NO pathway plays a key role in several cardioprotective pathways [8]. Recently, it has been reported that in the heart, 56% of all *S*-nitrosylated proteins are mitochondrial proteins and that 36% of the SNO proteome requires eNOS-derived NO [20]. Moreover, after ischemic pre-conditioning, mitochondrial proteins represent 52% of all *S*-nitrosylated proteins [51]. This could be explained by eNOS association with subsarcolemmal mitochondria (SSM) in response to ischemic pre-conditioning [75]. Indeed, incubation with a mitochondrial-specific NO-donor (mitoSNO) protects the heart during IR [16]. MitoSNO cardioprotection appears to be dependent on protein SNO and independent of cGMP-PKG activation [49], because it is not affected by ablation of the *PKG* gene in mouse cardiomyocytes. Thus, eNOS association with mitochondria and protein SNO are key elements to explain NO-dependent cardioprotection.

Despite the clear effect of physical exercise on mitochondria in healthy and diseased hearts, its role and the underlying mechanisms in exercise-induced cardiac pre-conditioning before IR are not clear [6]. Therefore, we investigated whether the cardioprotective effect of exercise pre-conditioning could be explained by eNOS association with mitochondria and the subsequent increase of NO bioavailability and protein SNO. Using western blotting, confocal microscopy, and SNO proteomic approaches, we found that exercise (1) increased eNOS/NO bioavailability in mitochondria, and, consequently, (2) modulated  $Ca^{2+}$ -dependent mitochondrial permeability transition and ROS production during IR.

## Materials and methods

Detailed information on the methodology is available in the Supplemental Information file.

### Animal model

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive 2010/63/EU (N° CEEA-00223) and approved by the French national research ethics committee (no. APAFIS#3487-2016010813,43,57). Male Wistar rats (12-week-old; weight = 225–275 g, Janvier, France) were randomly distributed in two groups: sedentary control group (Sed), and 5-week treadmill exercise group (Ex-Tr). At the end of the study, the impact of exercise training in the Ex-Tr group was confirmed by their higher maximal aerobic velocity (MAV), measured as previously described [62], compared with sedentary rats (Sed =  $36 \pm 1.58$  m/min; Ex-Tr:  $46.25 \pm 1.31$  m/min;  $p < 0.05$ ).

### Exercise protocol

Moderate exercise training was performed as previously described [23]. Briefly, rats exercised on a motor-driven treadmill (Ugo Basile, Transforming ideas into instruments, 47300) 45 min/day, 5 days/week for 5 weeks at 25 m/min ( $\approx 60\%$  of their MAV). To avoid the acute effects of exercise, rats were sacrificed 24 h after the last exercise training session.

### Measurement of ROS production following IR

#### In vivo IR

In vivo IR was performed as previously described [33]. To evaluate the eNOS/NO/SNO pathway implication in heart sensitivity to IR injuries and ROS production, Sed and Ex-Tr rats received one intraperitoneal injection of vehicle (0.9% NaCl) or L-NAME (50 mg/kg in 0.9% NaCl; Abcam ab120136) at 24 h and 30 min before ligation. After anesthesia, Sed and Ex-Tr rats were ventilated, and a thoracotomy was performed to expose the interventricular coronary artery that was subsequently ligated for 30 min, followed by 10 min of reperfusion. The ECG signal was recorded with subcutaneous electrodes. Heart rate and QT intervals were measured at baseline, at the end of ischemia, and after 10 min of reperfusion. The corrected QT (QTc) was calculated according to the Framingham Heart Study method in which the QT interval is adjusted for heart rate:  $QTc = QT + 0.154 \times [1 - RR]$ . The ischemic area was collected and embedded in optimal



cutting temperature (OCT from Tissue-Tek) and flash-frozen in liquid nitrogen.

#### IR in isolated hearts

IR in isolated hearts was performed as previously described [23]. Hearts were perfused or not with the NOS inhibitor L-NAME (Abcam, ab120136, 100  $\mu$ M) or the *S*-nitrosoglutathione (GSNO) reductase inhibitor (N6022, 10  $\mu$ M, Cayman Chemical) for 25 min.

#### Measurements of ROS production using the DHE fluorescent dye

Cardiac ROS production was measured as previously described [7].

#### Measurement of mitochondrial ROS (mtROS) and NO production in isolated cardiomyocytes

Ventricular cardiomyocytes were isolated as previously described [13].

#### Measurement of mtROS production

Adult cardiomyocytes (20,000 cell/mL) were distributed in a 96-well microplate and incubated (37 °C for 30 min) with MitoSOX Red, a fluorogenic probe sensitive to mtROS production (5  $\mu$ M, Ex: 510 nm; Em: 580 nm; Fisher Scientific, Invitrogen, M36008)[24], with or without L-NAME (100  $\mu$ M) or sodium L-ascorbate (1 mM). Then, they were immediately transferred to a microplate reader (Synergy HT Microplate Spectrophotometer Biotek). Cells were stimulated with 10  $\mu$ M of antimycin A (10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), a complex III blocker, to force mtROS production.

#### Measurement of NO production

NO production was measured as previously described [19]. Cardiomyocytes from Sed and Ex-Tr rats were loaded with the fluorescent NO-sensitive dye 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF2-DA; 5  $\mu$ M; Ex: 491 nm, Em: 513 nm, Abcam; ab145283) at 37 °C for 15 min. Then, cardiomyocytes were distributed in a 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, platform 3A AU/INRAE microscopy facility).

#### Mitochondrial calcium retention capacity and swelling assays

Cardiac mitochondria were isolated as previously described [7] (Fig. 1a).

#### Calcium retention capacity

Calcium retention capacity (CRC) was examined as previously described [1, 57] using the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Calcium Green-5N (1  $\mu$ M, Invitrogen, C3737) as extramitochondrial calcium probe. Mitochondria were incubated or not with sodium L-ascorbate (1 mM) to evaluate SNO impact [75], and with the NO-donor GSNO (500  $\mu$ M). Some mitochondria were obtained from isolated hearts perfused or not with L-NAME for 25 min. Calcium Green-5N fluorescence was measured throughout the experiments using excitation/emission wavelengths of 507/536 nm and a microplate reader (Synergy HT Microplate Spectrophotometer Biotek).

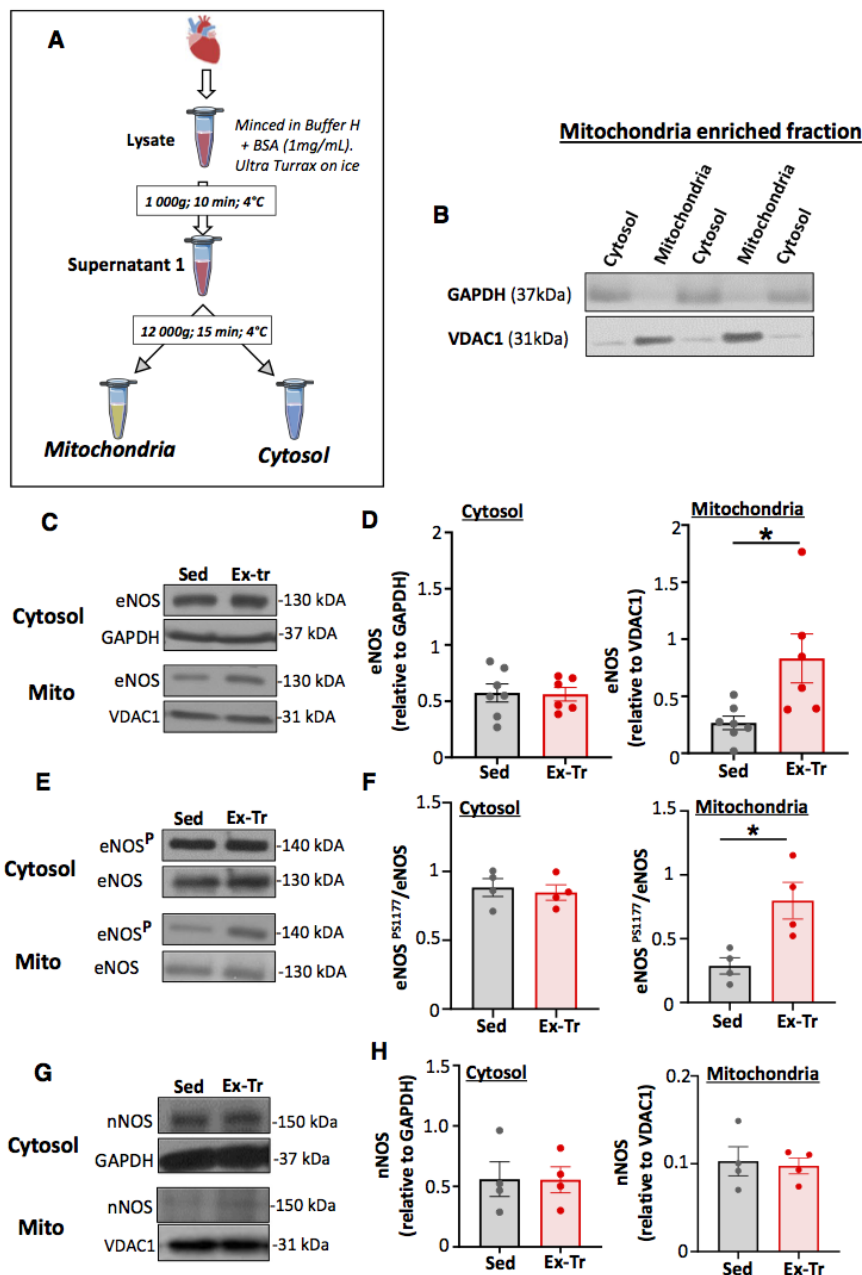
#### Calcium swelling assay

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

#### Proteomics and SNO proteomics

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

Intact heart mitochondria (1 mg/mL) and total LV homogenates were isolated as previously described [43, 55]. Proteins were extracted in HENS buffer, followed for mitochondria by three freeze/thaw cycles in liquid nitrogen and vigorous vortexing. Lipid fragments were collected by centrifugation at 10,000g, 4 °C, for 10 min. SNO occupancy was determined using the iodoacetyl Tandem Mass Tag (iodoTMT) labeling and enrichment kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA); see Fig. 3a and Suppl Fig. 7A for a depiction of the labeling protocol. All procedures were performed according to the manufacturer's instructions. Labeled peptides were analyzed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) that was performed using an Ultimate 3000 nano-LC system coupled to a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) operated as described previously [32]. 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 for the 20 most abundant precursor ions with 10 s 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 by the Q-Exactive HF mass spectrometer were analyzed with the 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). Protein abundance between groups was compared with the  $T$  fold test [11]. The mixOmics package for R (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/mixOmics.html>) was used for the PLS-DA and sPLS-DA analyses [65].

**Fig. 1** Exercise training increases eNOS level and phosphorylation, but does not modify nNOS, in the mitochondrial subfraction. **a** Schematic representation of the SSM isolation protocol. Heart lysates were fractionated by differential centrifugation. Centrifugation, homogenization, and enzymatic reactions were performed at 4 °C. **b** Representative western blots of the cytosolic and mitochondrial subfractions obtained with anti-GAPDH and anti-VDAC1 antibodies. **c, d** Effect of exercise training on eNOS level in the cytosolic and mitochondrial subfractions. **c** Representative western blots of eNOS level in the cytosolic and mitochondrial subfractions. **d** Quantification of eNOS level in the cytosolic (left panel) and mitochondrial (right panel) subfractions analyzed by western blotting in hearts from sedentary (Sed;  $n=7$  hearts in duplicate) and exercise trained (Ex-Tr;  $n=6$  hearts in duplicate) rats. eNOS level was expressed relative to GAPDH level in cytosolic samples and to VDAC1 level in mitochondria samples. **e, f** Effect of exercise training on eNOS phosphorylation at serine 1177 (eNOS-P<sup>ser1177</sup>) in the cytosolic and mitochondrial subfractions. **e** Representative western blots of eNOS-P<sup>ser1177</sup> in the cytosolic and mitochondrial subfractions. **f** Quantification of eNOS-P<sup>ser1177</sup> level in the cytosolic (left panel) and mitochondrial (right panel) subfractions from Sed ( $n=4$  hearts in duplicate) and Ex-Tr ( $n=4$  hearts in duplicate) rats. eNOS-P<sup>ser1177</sup> level was expressed relative to eNOS level. **g, h** Effect of exercise training on nNOS level in the cytosolic and mitochondrial subfractions. **g** Representative western blots of nNOS level in the cytosolic and mitochondria subfractions. **h** Quantification of nNOS level in the cytosolic (left panel) and mitochondrial (right panel) subfractions from Sed ( $n=4$  hearts in duplicate) and Ex-Tr ( $n=4$  hearts in duplicate) rats. nNOS level was expressed relative to GAPDH level for cytosolic fractions and to VDAC1 level for mitochondrial fractions ( $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr, parametric  $t$  test). Data are the mean  $\pm$  SEM

The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [60] partner repository under the dataset identifiers PXD023515 and 10. 6019/PXD023515 [reviewers may access this private dataset using reviewer\_pxd023515@ebi.ac.uk as Username and vmykdlpb as password] for the S-nitrosoproteomic analysis.

### Western blotting

Immunoblotting was performed using standard techniques, as previously described [50].

### Statistical analyses

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Experimental conditions were compared with Student's  $t$  test, analysis of variance (ANOVA), or repeated-measures ANOVA followed by the Turkey's multiple comparisons test when data were normally distributed (confirmed with the Shapiro–Wilk normality test). When necessary, non-parametric tests were used: Mann–Whitney test for two groups, or Kruskal–Wallis test followed by the Dunn's multiple comparisons test. A value of  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

Statistical analyses were done with the GraphPad Prism software (8.4.3).

## Results

### Exercise training increases eNOS level and activation in the mitochondrial subfraction

It is acknowledged that exercise training activates eNOS in the heart, a key trigger of exercise-induced cardioprotection [10, 23]. As cardiac ischemic pre-conditioning induces eNOS re-localization from the cytosol to mitochondria [75], we first asked whether exercise training had the same effect. To this aim, we isolated by differential centrifugation the cytosolic and mitochondrial subfractions from the heart of Sed and Ex-Tr (treadmill running for 45 min/day, 5 days/week for 5 weeks at 25 m/min,  $\approx 60\%$  of their MAV) rats (Fig. 1a), and confirmed their separation by western blotting with antibodies against VDAC1 (mitochondria marker) and GAPDH (cytosolic marker) (Fig. 1b). In the cytosolic fraction, eNOS level was comparable in Sed and Ex-Tr samples (Fig. 1c, d), as we previously reported using total heart homogenates [10, 23]. Conversely, eNOS level was significantly higher in Ex-Tr than Sed mitochondrial samples (Fig. 1c, d). Similarly, eNOS level was significantly increased only in the mitochondrial subfraction after a single bout of exercise (35 min) (mitochondrial eNOS normalized to cytosolic eNOS; Supplementary Fig. 1a), suggesting that eNOS re-localizes from the cytosol to mitochondria in response to exercise. In cardiomyocytes, there are two populations of mitochondria: subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar (IFM) mitochondria. However, our protocol mainly allows the isolation of SSM. Therefore, we next evaluated whether exercise training also influenced eNOS level in the IFM-enriched fraction (containing both myofilaments and IFM). In this fraction, eNOS level was increased in response to exercise training (Supplementary Fig. 1c, d). This strengthened the hypothesis that in response to exercise, eNOS can re-localize from the cytosol to specific microdomains that contain mitochondria. As eNOS is activated by phosphorylation on serine 1177 (eNOS-P<sup>ser1177</sup>), we then evaluated the effect of exercise training on this phosphorylation. The level of eNOS-P<sup>ser1177</sup> was significantly increased in the mitochondrial fraction of Ex-Tr compared with Sed rats, but not in the cytosolic fraction (Fig. 1e, f). We [23] and others [10] previously reported that exercise training does not have any impact on the level of neuronal NOS (nNOS), and another NOS isoform also expressed in heart. We confirmed this observation in the cardiac cytosolic and mitochondrial fractions (Fig. 1g, h). Altogether, these results indicate that eNOS association



with mitochondria is increased in response to exercise training.

### Exercise training increases NO production in response to oxidative stress

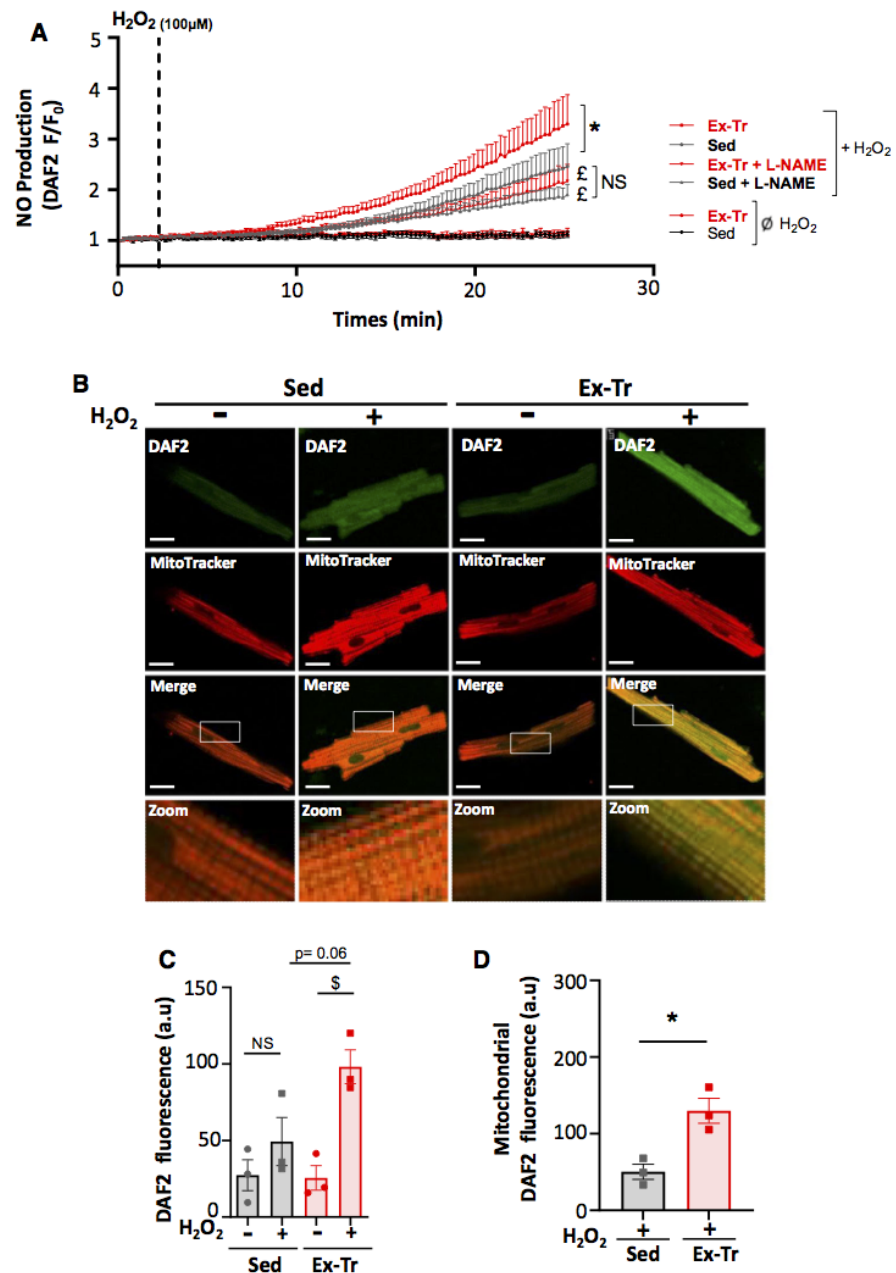
As exercise training increased eNOS activation and level in mitochondria, we next evaluated whether exercise training also promoted NO production in response to a stress that mimics IR in primary cardiomyocytes isolated from Ex-Tr and Sed rats. We first confirmed that eNOS re-localizes from the cytosol to mitochondria in Ex-Tr cardiomyocytes, but not in Sed cardiomyocytes (Supplementary Fig. 2a, b). Next, we used the NO-sensitive DAF2-DA fluorescent dye (5  $\mu\text{M}$ ) to measure intracellular NO every 10 s for 25 min in primary cardiomyocytes isolated from Ex-Tr and Sed rats before (basal conditions) and after addition or not of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) to promote eNOS-dependent NO production [68] and to mimic IR-induced oxidative stress. We pre-incubated some cardiomyocytes with the NO synthase inhibitor L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min before NO measurement to evaluate the contribution of NOS-dependent NO production. In basal conditions, DAF2-DA fluorescence intensity remained unchanged over time (Fig. 2a). Addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  resulted in a progressive increase of the fluorescence signal in Ex-Tr and, to a lesser extent, also in Sed cardiomyocytes (Fig. 2a). In cardiomyocytes pre-incubated with L-NAME, this increase was reduced compared with cells without L-NAME, and consequently, fluorescence intensity was similar in Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (Fig. 2a and Supplementary Fig. 3a). To determine whether NO production by cardiomyocytes upon exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  was localized in mitochondria, we used confocal microscopy to analyze cardiomyocytes stained with DAF2-DA (NO production marker) and with MitoTracker (mitochondrial stain). As before, we did not observe any difference between Ex-Tr and Sed cardiomyocytes in basal conditions (no  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Conversely, DAF2-DA fluorescence intensity increased in Sed cells (+80%;  $p=0.3$ ) and particularly in Ex-Tr cells (+183%;  $p<0.05$ ) after  $\text{H}_2\text{O}_2$  addition (Fig. 2b, c). Pre-incubation with L-NAME reduced DAF2-DA fluorescence intensity in both Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (Supplementary Fig. 3b-c). It has been reported that in cardiomyocytes, NO-dependent DAF2-DA fluorescence signal is localized in mitochondria [19]. By merging the DAF2-DA and MitoTracker signals, we observed their colocalization in Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (Fig. 2b, Supplementary Fig. 3d, e), with a good Pearson's correlation coefficient ( $r^2=0.85$  for Sed;  $r^2=0.89$  for Ex-Tr). We next quantified DAF2-DA fluorescence intensity specifically in mitochondria (based on the MitoTracker signal). Upon exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DAF2-DA fluorescence intensity (indicative of NO production) was higher in mitochondria of Ex-Tr than Sed cardiomyocytes

(Fig. 2d). Altogether, these findings suggest that exercise training increases NO bioavailability in mitochondria of cardiomyocytes.

### Exercise training modifies the S-nitrosylation profile of mitochondrial protein.

As eNOS/NO-dependent cardioprotection has been mostly attributed to protein SNO [74], we next used a proteomic approach to evaluate the impact of exercise training on the protein SNO profiles of total left ventricle (LV) homogenates and mitochondrial samples from Sed and Ex-Tr hearts. In this approach, the iodoTMT switch assay was followed by enrichment of TMT-labeled peptides using an anti-TMT resin, and shotgun proteomics by nano-LC-MS/MS (Fig. 3a). Using this redox proteomic approach, we identified 296 and 345 proteins with at least one TMT-labeled modification in total LV homogenates and mitochondrial samples, respectively. Among the 345 proteins identified in mitochondrial samples, 125 were mitochondrial proteins. Next, we compared the SNO profile of individual proteins in total LV homogenates and mitochondrial samples from Sed and Ex-Tr hearts. Volcano plots showed no major effect of exercise training on protein SNO in total LV homogenates (Fig. 3b). Conversely, the extent of protein SNO tended to be higher in mitochondrial subfractions from Ex-Tr rats, particularly for mitochondrial proteins (red dots) (Fig. 3c). We did not observe any clear separation between groups and cell subfractions by unsupervised partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA). Therefore, we used a supervised PLS-DA and all proteins (345 proteins from 12 samples; 3 samples/subfraction/condition) to determine the separation between subfractions/conditions and identify the proteins the abundance of which contributed to separate the groups. This approach separated total LV homogenates and mitochondrial fractions along component 1, and Sed and Ex-Tr samples as well as total LV homogenates (TH) and mitochondria along component 2 (Fig. 3d). Moreover, the Sed and Ex-Tr mitochondrial fractions were separated along component 3 (Fig. 3e). We identified 20 proteins that contributed to explain the separation of the Sed and Ex-Tr mitochondrial subfractions along component 3 (Fig. 3e). This subgroup of proteins included eleven mitochondrial proteins and nine proteins that can directly interact with mitochondria. We then used another approach based on the S-nitrosylated proteins that were more abundant in mitochondria in response to exercise training. Using an optimized cut-off (fold change > 1.5,  $p$  value < 0.05), we identified five mitochondrial proteins, including two proteins already identified with the first method (connexin 43 and coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2, CHCHD2) (spectral counts in Fig. 3f). On the basis of its biological importance during IR and its trend to be more abundant in the Ex-Tr group

**Fig. 2** Effect of exercise training on NO production in isolated cardiomyocytes. **a** Cardiomyocytes (100,000 cells/ml) from Sed and Ex-Tr hearts ( $n=5$  hearts per group) were loaded with a fluorescent dye sensitive to NO production (DAF2; 5  $\mu$ M), pre-incubated or not with L-NAME (100  $\mu$ M) and stimulated or not with  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M). Fluorescence was measured every 10 s for 30 min and was normalized to the baseline fluorescence ( $F_0$ ). Changes in NO production are expressed as  $F/F_0$  ( $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr;  $^{\$}p < 0.05$   $H_2O_2$  effect; repeated two-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparisons test). **b** Confocal images of left ventricle cardiomyocytes from Sed and Ex-Tr rats loaded simultaneously with DAF-2 (green channel, emission 491/513 nm; 5  $\mu$ M) and MitoTracker Orange (red channel, emission/excitation 554/576 nm; 200 nM). Colocalization is shown in the merged images. **c** Quantification of DAF2 fluorescence intensity in cardiomyocytes ( $n=3$  hearts per group, each point corresponds to the mean of DAF2 fluorescence intensity measured in at least 8 cells/heart);  $^{\$}p < 0.05$   $H_2O_2$  effect (parametric one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparisons test). **d** Quantification of mitochondrial DAF2 fluorescence intensity ( $n=3$  hearts per group, each point corresponds to the mean of DAF2 fluorescence intensity measured in at least 8 cells/heart);  $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr (parametric  $t$  test). Data are the mean  $\pm$  SEM

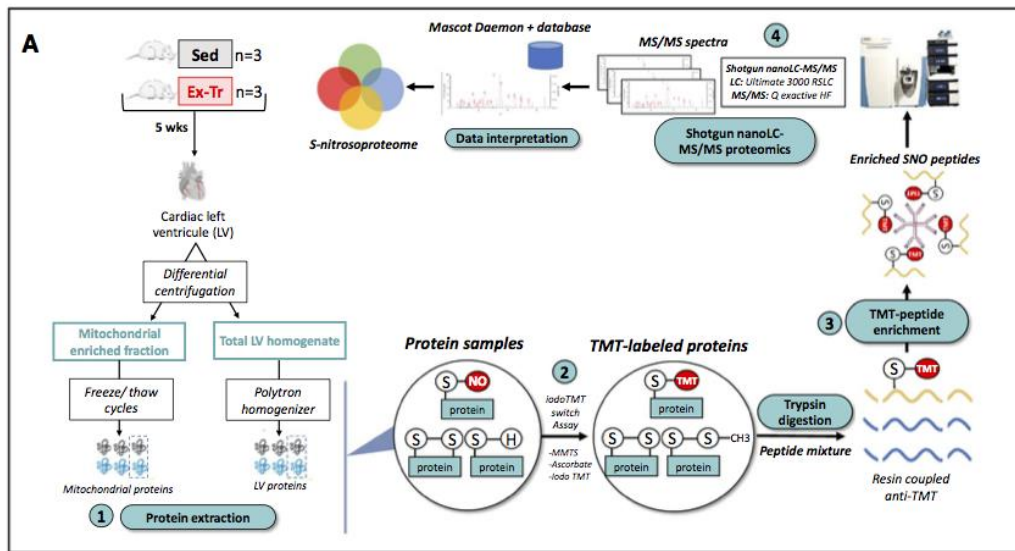
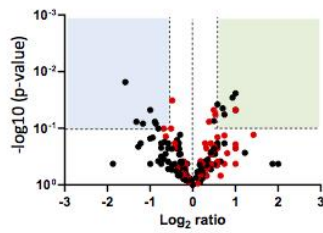
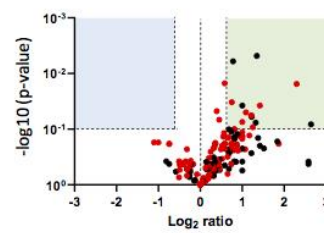
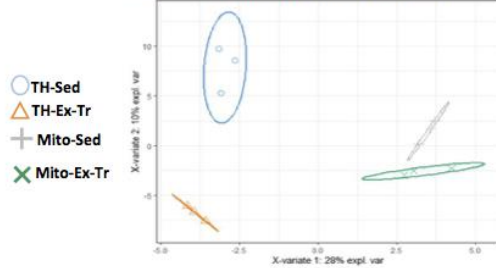
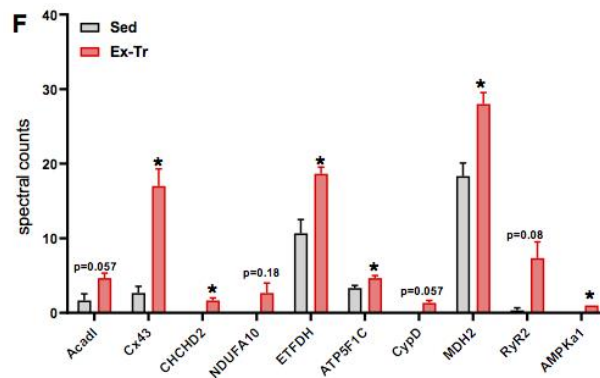
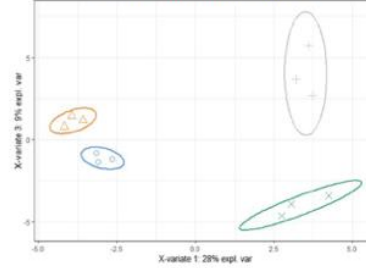


(fold change: 2.33;  $p=0.0572$ ), we also added cyclophilin D (PPIF) to this list of proteins. Proteins involved in the electron transport chain (ETC) regulation (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex 10-like1, NDUFA10; electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, ETFDH; CHCHD2, and connexin 43), in mitochondrial  $\beta$ -oxidation (acyl-CoA dehydrogenase, long chain), in the TCA cycle (malate dehydrogenase 2), in calcium homeostasis (ryanodine receptor 2 and connexin 43), in the regulation

of energetic metabolism (AMPK $\alpha$ 1), and in the regulation of mPTP activation (cyclophilin D) explained the differences in protein SNO profile between Sed and Ex-Tr mitochondria.

### Exercise training prevents $Ca^{2+}$ -induced mPTP opening: a major role for S-nitrosylation

As exercise training affected the SNO profile of key proteins involved in ETC and in cardioprotective signaling

**B** LV total homogenates**C** LV mitochondria**D** sPLS-DA on TMT-TH&Mito, comp 1 & 2**E** sPLS-DA on TMT-TH&Mito, comp 1 & 3



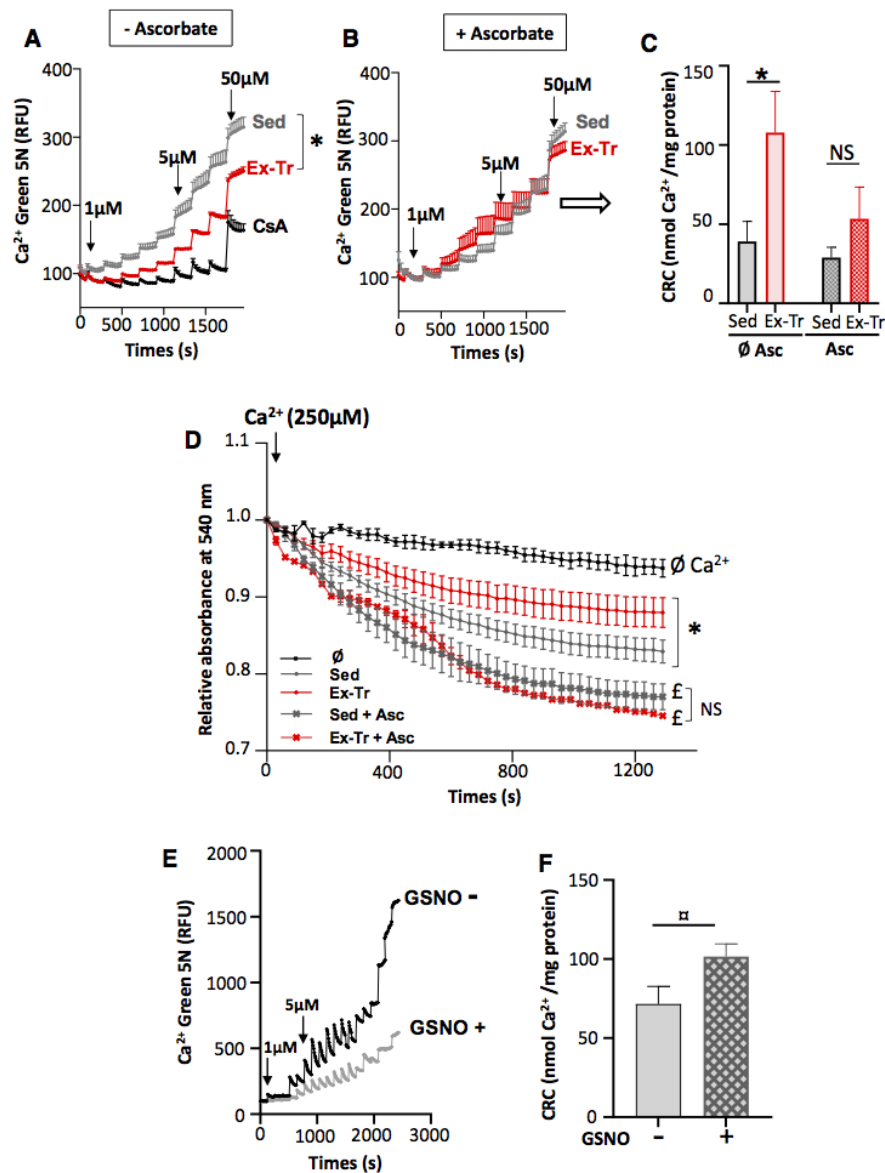
**Fig. 3** Effect of exercise training on SSM protein S-nitrosylation profile. **a** Schematic illustration of the site-specific S-nitrosoproteomic analysis in the mitochondrial subfractions and total left ventricle (LV) homogenates from Sed ( $n=3$ ) and Ex-Tr ( $n=3$ ) hearts. (1) Protein extraction, (2) SNO occupancy was determined by Iodoacetyl Tandem Mass Tag™ (iodoTMT™) labeling, and (3) TMT-peptide enrichment, (4) liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis followed by data interpretation using the Mascot Daemon software. **b, c** Volcano plot showing the  $-\log_{10} p$  value vs. the  $\log_2$  expression levels representing the SNO changes of individual proteins in response to exercise training versus sedentary condition. Red dots, mitochondrial proteins; black dots, non-mitochondrial proteins. Blue and green squares represent the cut-off of fold change  $> 1.5$ ,  $p < 0.1$ . 296 proteins with at least one TMT-labeled modification were identified in the total LV homogenates (**b**), and 345 proteins in the enriched mitochondrial subfractions (**c**). **d** Supervised partial least-squares discriminant analysis (sPLS-DA). Component 1 versus Component 2, using 95% confidence ellipses. TH, total left ventricle lysates. **e** Component 1 versus component 3, using 95% confidence ellipses obtained by supervised partial least-squares discriminant analysis. TH, total LV homogenates. **f** Spectral counts of key proteins that explain the differences in the Sed and Ex-Tr S-nitrosoproteome profiles obtained in mitochondrial samples;  $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr ( $t$  test with Welch's correction)

pathways, we next investigated whether exercise training also influenced mPTP activation in response to mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload. For this, we performed a mitochondrial CRC test in isolated mitochondria. We first confirmed that our test was well designed to evaluate mPTP activation by showing that incubation with cyclosporine A, 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 with untreated mitochondria from Sed and Ex-Tr hearts (Fig. 4a). As previously published [45, 46], we found that the CRC was higher in isolated mitochondria from Ex-Tr than Sed hearts (Fig. 4a). Next, to evaluate SNO role in mitochondrial CRC, we pre-incubated isolated mitochondria with ascorbate (1 mM), a reducing agent that decomposes SNO [31]. Ascorbate had only a moderate effect on CRC in mitochondria from Sed hearts, but strongly reduced it in mitochondria from Ex-Tr hearts (Fig. 4b, c). Consequently, the CRC differences between Sed and Ex-Tr mitochondria (Fig. 4a) were abolished following pre-incubation with ascorbate (Fig. 4c). We confirmed these results by assessing CRC in mitochondria isolated from hearts perfused or not with L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), a NOS inhibitor, for 25 min (Supplementary Fig. 4a–c), thus validating NO role in the increased CRC in mitochondria of Ex-Tr hearts. To further confirm protein SNO role in mitochondria, we evaluated mPTP opening by monitoring the rapid inflow of solutes in mitochondria and their subsequent swelling through absorbance measurement in response to exposure to a single high concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu\text{M}$ ). Consistent with our previous results, mitochondrial swelling (i.e., the decrease of absorbance) was lower in mitochondria of Ex-Tr than Sed hearts (Fig. 4d). Pre-incubation with ascorbate further

increased mitochondrial swelling in both Sed and Ex-Tr mitochondria and abolished the difference between these groups (Fig. 4d). To further confirm NO effect on mitochondrial CRC, we evaluated CRC in mitochondria incubated or not with the NO-donor GSNO (500  $\mu\text{M}$ ). GSNO increased mitochondrial CRC (Fig. 4e, f). Altogether, these results confirm that exercise training has a beneficial impact on the mitochondrial response to increased  $\text{Ca}^{2+}$  load as observed during IR, and highlight protein SNO key role in this effect.

### Exercise training reduces 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 [27]. According to a previous study, SNO of mitochondrial proteins contributes to limit mtROS production during IR [16]. Thus, we asked whether exercise training modulated mtROS production and whether SNO had a role. For this, we loaded cardiomyocytes with MitoSOX Red (5  $\mu\text{M}$ ), a sensitive mtROS probe [2], and incubated them or not with ascorbate or L-NAME (to evaluate the eNOS/NO/SNO pathway implication in mtROS production) for 30 min. Then, we stimulated cells with antimycin A (10  $\mu\text{M}$ ), a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, to force mtROS production before determining the fluorescence intensity every 20 s for 15 min (Fig. 5a) [7]. In both Sed and Ex-Tr cardiomyocytes, MitoSOX Red fluorescence intensity increased progressively for 15 min after antimycin A addition, and mtROS production tended to be higher in Ex-Tr than Sed cardiomyocytes (not significant) (Fig. 5a, b). Incubation with ascorbate or L-NAME significantly increased mtROS production in Ex-Tr cardiomyocytes, but not in Sed cardiomyocytes (Fig. 5a, b). This suggested that the increased NO bioavailability in cardiomyocytes in response to exercise training contributes to modulate mtROS production during stress. Next, we performed global IR in perfused isolated hearts to evaluate the impact of exercise training on ROS production (Fig. 5c). As mitochondrial oxidative stress is a key trigger of cardiac injuries and dysfunction [9], we measured, using the DHE fluorescent dye, ROS production during early reperfusion in hearts from Sed and Ex-Tr rats. In line with the previous studies [23], post-IR ROS production was lower in Ex-Tr than Sed hearts (Fig. 5d). When we perfused hearts with MitoTEMPO (0.1  $\mu\text{M}$ ), a specific mtROS scavenger, at a concentration previously used to limit cardiac mtROS production [7, 54], we found that the difference between Sed and Ex-Tr hearts was abolished (Supplementary Fig. 6). This suggests that mtROS contributes mainly to the difference observed between Sed and Ex-Tr hearts. To evaluate the role of the eNOS/NO/SNO pathway in ROS production during early reperfusion, we perfused Sed and Ex-Tr hearts with L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) for



**Fig. 4** Effect of exercise training on mitochondrial calcium retention capacity and mPTP activation: a key role for S-nitrosylation. **a–c** Calcium retention capacity (CRC) in mitochondria from Sed (15 experiments from  $n=5$  hearts) and Ex-Tr (12 experiments from  $n=4$  hearts) hearts was monitored using the Calcium Green-5N probe (Em: 507 nm; Ex: 536 nm). **a, b** Mean traces of the CRC tests. 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, representative trace in the presence of 2  $\mu$ M cyclosporine A (CsA; 2  $\mu$ mol/L). CRC was tested in the absence (**a**) or presence (**b**) of sodium L-ascorbate (1 mmol/L) in mitochondria obtained from Sed (9 experiments from  $n=3$  hearts) and Ex-Tr (12 experiments from  $n=4$  hearts) hearts ( $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr, repeated two-way ANOVA followed by the Sidak's multiple com-

parisons test). **c** Quantification of CRC (nmol  $\text{Ca}^{2+}$  per mg protein);  $*p < 0.05$ , Sed vs Ex-Tr (non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test). **d** Mitochondrial swelling assay in mitochondria from Sed and Ex-Tr hearts. Mitochondrial swelling was induced by adding  $\text{Ca}^{2+}$  (250  $\mu$ M) to mitochondria isolated from Sed ( $n=6$ ) and Ex-Tr ( $n=5$ ) hearts incubated or not with sodium L-ascorbate (1 mmol/L). Absorbance was monitored at 540 nm every 30 s ( $*p < 0.05$  Sed vs Ex-Tr;  $^{\ddagger}p < 0.05$  with ascorbate vs without ascorbate; repeated two-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparisons test). **e** Representative CRC traces in mitochondria pre-treated or not with 500  $\mu$ M of GSNO. **f** Quantification of CRC in the presence (12 experiments,  $n=4$  hearts) or absence (9 experiments,  $n=3$  hearts) of GSNO ( $^{\ddagger}p < 0.05$  GSNO (+) vs GSNO (-); non-parametric Mann–Whitney test). Data are the mean  $\pm$  SEM



20 min before ischemia and during early reperfusion. We previously reported that L-NAME perfusion results in the loss of exercise-induced cardioprotection in rats [23]. Here, we first confirmed, using the iodoTMT switch assay (Supplementary Fig. 7a) and western blot analysis, that L-NAME resulted in lower protein SNO levels in SSM isolated from Sed and Ex-Tr hearts (Supplementary Fig. 7b, c), as previously described [40]. In these conditions, we then measured ROS production by monitoring DHE fluorescence. L-NAME markedly increased (+48%) ROS production in Ex-Tr hearts during early reperfusion, but not in Sed hearts (−3%) (Fig. 5d), indicating that NO is essential to blunt ROS production during post-ischemic reperfusion in exercised hearts.

Given the protective role of protein SNO during early reperfusion, we next evaluated whether N6022 (10 μM), a specific and potent GSNO reductase inhibitor that increases protein SNO level [12], could limit ROS production during early reperfusion (Fig. 5e). In line with results obtained after exercise training in rats, N6022 significantly reduced the cardiac DHE fluorescence signal after 10 min of post-ischemic reperfusion (Fig. 5f), indicating lower post-ischemic ROS production.

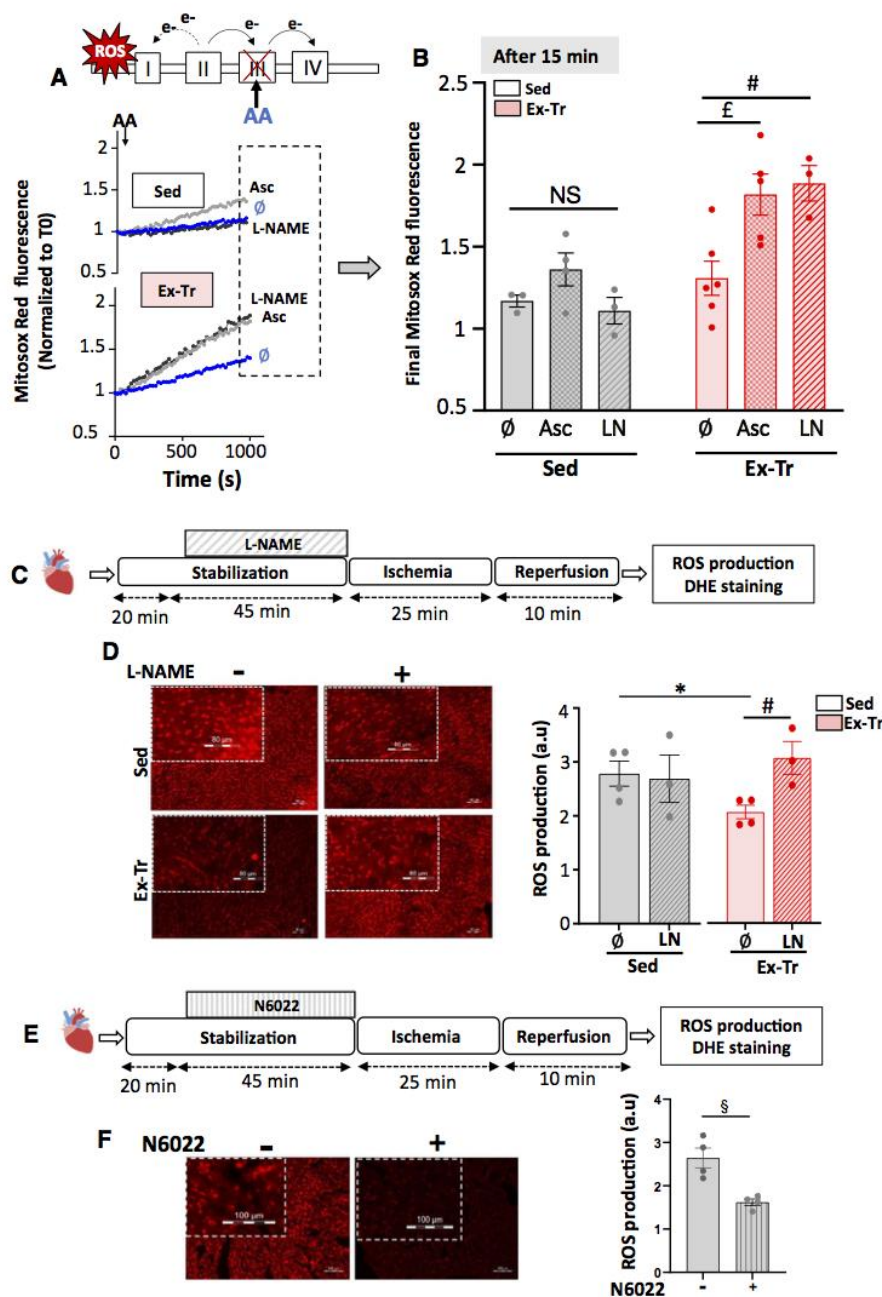
Finally, to confirm in vivo our in vitro and ex vivo results, we performed cardiac IR in Sed and Ex-Tr rats treated or not with L-NAME (50 mg/kg i.p.) 24 h and 30 min before IR, because it has been reported that L-NAME decreases NO bioavailability [3] and mitochondrial protein SNO [40]. We then compared their ECG profiles throughout IR. Before ischemia, we did not observe any ECG difference between groups (Fig. 6a, b). Ischemia resulted in an elevation of the ST segment and prolongation of the QTc interval, compared with baseline, in all groups (Fig. 6a). After 10 min of reperfusion, the QTc interval was significantly prolonged by 19% in Sed animals ( $p < 0.05$ ;  $t$  test) compared with baseline, and also in Sed animals treated with L-NAME (by 17.8%; not significant:  $p = 0.1$ ). We did not observe any difference between Sed animals treated or not with L-NAME (Fig. 6c). In Ex-Tr animals, the QTc interval was only prolonged by 3%, and after 10 min of reperfusion, and was lower than in Sed animals (Fig. 6a–c). On the other hand, in Ex-Tr animals treated with L-NAME, the QTc interval was prolonged by 11% after 10 min of reperfusion ( $p = 0.06$  compared with baseline), and was significantly higher than in untreated Ex-Tr animals (Fig. 6a–c). We next evaluated whether our experimental conditions influenced mitochondrial permeability transition during reperfusion. To this aim, we stained cardiac tissues with calcein-cobalt after 10 min of reperfusion. We did not observe any significant difference between Sed and Ex-Tr hearts (Suppl Fig. 8). However, we found that L-NAME treatment tended to reduce calcein fluorescence in Sed (−14.3%;  $p = 0.18$ ) and also in Ex-Tr hearts (−20.1%;  $p = 0.08$  vs untreated), indicative of increased mitochondrial

permeability transition (Suppl Fig. 8). This suggests that NO could contribute to modulate mPTP activation during early reperfusion and that exercise training contributes, although moderately, to this effect. As in isolated hearts eNOS-NO-SNO signaling influenced ROS production during early reperfusion only in Ex-Tr hearts, we then measured ROS production in the ischemic area using the DHE fluorescent dye. In line with results obtained in isolated hearts, we found that L-NAME treatment did not influence ROS production in Sed animals, but strongly increased its production in Ex-Tr rat hearts (Fig. 6d). Altogether, these results show that in exercised hearts, NO-SNO signaling plays a key role in limiting excessive mtROS production during early reperfusion.

## Discussion

Our results clearly support the hypothesis that the eNOS/NO/SNO pathway plays a key role in the exercise ability to protect mitochondria during IR. Specifically, we found that exercise training (1) increases NO bioavailability in mitochondria, (2) results in SNO of key proteins involved in the mitochondrial response to stress, and (3) modulates  $Ca^{2+}$ -dependent mPTP opening and ROS production in conditions that mimic IR. Collectively, these results provide additional insights to better understand eNOS role in exercise-induced cardioprotection.

There is now considerable evidence, indicating that eNOS/NO signaling plays a central role in exercise-induced cardioprotection during IR [10, 23]. This eNOS-dependent cardioprotection is mediated through the increase of NO metabolite storage (i.e., nitrite and *S*-nitrosothiols) before ischemia and higher protein SNO during early reperfusion [23, 61]. However, the underlying mechanisms and the identification of specific SNO sites remain limited. Here, we showed that mitochondria constitute a privileged target of NO-dependent cardioprotective signaling in response to exercise training. Mitochondria are end-effectors of cell death, and many cardioprotective signaling mechanisms converge to mitochondria [52]. In line with our results, a previous study showed that in response to ischemic pre-conditioning, eNOS can translocate from the cytosol to mitochondria and increase the level of protein SNO [75]. However, the underlying mechanisms were not elucidated. The interactions between caveolae, caveolin-3, and eNOS could play a key role. Indeed, in a model of cardiac ischemic pre-conditioning, disruption of caveolae with a cholesterol sequestering agent [72] or caveolin-3 gene deletion [75] abolished eNOS translocation to mitochondria and the subsequent increase in protein SNO. Interestingly, both caveolae and caveolin-3 are considered stretch-sensitive elements in cardiomyocytes. As exercise increases the mechanical workload



and results in myocardial stretch, it could constitute a key trigger of eNOS association with mitochondria. Nevertheless, additional studies are necessary to better understand this effect. Adrenergic stress also could trigger eNOS activation and translocation. Indeed, in mice in which the gene encoding  $\beta$ 3-adrenergic receptor was ablated, exercise training does not activate eNOS and the exercise cardioprotective effect is lost [10]. Upon re-localization to mitochondria,

eNOS certainly does not enter mitochondria, because it does not harbor the transport sequence required for passing through the inner mitochondrial membrane [38]. However, eNOS can dock on the outer mitochondrial membrane, where it constitutes a NO source to regulate mitochondrial respiration [25].

In cardiomyocytes, there are two populations of mitochondria (SSM and IFM). It was previously reported that



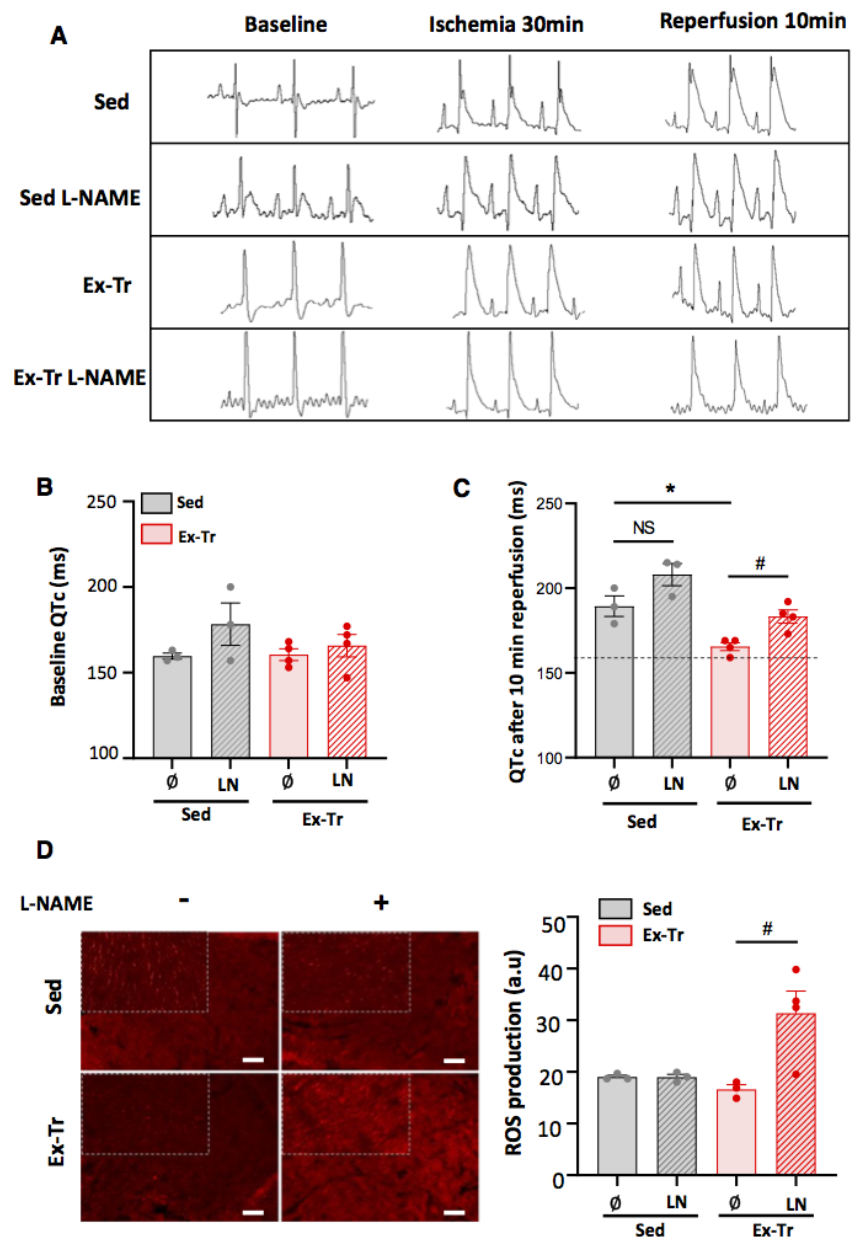
**Fig. 5** Effect of exercise training on mitochondrial ROS production: a major role for protein S-nitrosylation. **a, b** Sed and Ex-Tr cardiomyocytes (100,000 cells/mL) isolated from 3 to 6 independent hearts/group were loaded with MitoSOX Red, a fluorescent dye sensitive to mitochondrial ROS production (Ex: 510 nm; Em: 580 nm; 5  $\mu$ M) that can detect superoxide anion production in mitochondria. Fluorescence was measured every 20 s and normalized to baseline fluorescence ( $F/F_0$ ). Cardiomyocytes were stimulated with antimycin A (AA, 10  $\mu$ M), a mitochondrial electron transport chain complex III blocker, to force ROS production by mitochondria. Some myocytes were incubated with sodium L-ascorbate (Asc; 1 mM) or L-NAME (LN; 100  $\mu$ M) for 30 min before AA addition. **b** Mean fluorescence level after 15 min ( $^{\dagger}p < 0.05$  ascorbate effect;  $^{\#}p < 0.05$  L-NAME effect, non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison 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 or not with L-NAME (LN; 100  $\mu$ M) for 45 min using a Langendorff apparatus. 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 perfused or not with L-NAME (LN). Scale bar=80  $\mu$ m. DHE fluorescence intensity was quantified in 20 images from 3 to 4 hearts in each group;  $^*p < 0.05$  Ex-Tr vs Sed,  $^{\#}p < 0.05$  with vs without L-NAME effect (parametric  $t$  test). **e** Schematic illustration of the experimental protocol (only sedentary animals were used). Hearts were stabilized for 20 min and then perfused ( $n=4$ ) or not ( $n=4$ ) with the GSNO reductase inhibitor N6022 (10  $\mu$ M) for 45 min. Then, hearts underwent global no-flow ischemia for 20 min followed by 10 min of reperfusion. **f** ROS production in hearts of control animals pre-treated or not with N6022 was monitored by quantifying DHE fluorescence at 10 min after ischemia reperfusion. DHE fluorescence intensity was quantified in 20 images from 4 hearts in each group ( $^{\S}p < 0.05$  with vs without N6022; parametric  $t$  test). Data are the mean  $\pm$  SEM

in response to ischemic pre-conditioning, eNOS translocates preferentially to SSM [75]. Here, we found that in response to exercise training, eNOS re-localizes both to the SSM and IFM + myofilament subfractions. These results are supported by the increased NO production in mitochondria of isolated Ex-Tr cardiomyocytes. We also showed that both SSM (Fig. 4a–c) and IFM (Supplementary Fig. 5c–e) were protected by exercise training and were sensitive to denitrosylation by ascorbate. This highlights the key role of eNOS/NO/SNO signaling in this effect. However, in line with previous work [75], SNO role seemed to be more obvious in SSM than IFM. Although SSM represent only about 10% of all cardiac mitochondria, they are more vulnerable to IR and are the first to be affected in IR injuries [56, 75]. Specifically, SSM might be more sensitive to calcium overload and alterations of oxidative phosphorylation than IFM [48, 63]. In addition, the enzymatic antioxidant system is altered by IR in cardiac SSM but not in IFM [26, 37]. The fact that the junction protein connexin 43 is only present in SSM and is markedly targeted by SNO in Ex-Tr hearts might contribute to explain eNOS/NO key role. Connexin 43 has been identified in the sarcolemma and also in mitochondria of cardiomyocytes, and is mainly located in the inner mitochondrial membrane of SSM. Its role in

mitochondria remains controversial. Mitochondrial connexin 43 influences the mitochondrial respiratory function, ETC [4], ATP synthesis, and ROS production [64]. Connexin 43 also plays a key role in the modulation of cardiac IR injuries [64]. Indeed, mitochondrial CRC is reduced by blocking connexin 43 with the specific inhibitor Gap27 [71]. Moreover, protection by ischemic pre-conditioning is lost in cardiomyocytes and hearts of heterozygous connexin 43-deficient mice [29]. It has been proposed that SNO of mitochondrial connexin 43 upon ischemic pre-conditioning might explain the link between NO and connexin 43 in the signal transduction cascade of cardioprotective interventions [70]. This in line with our results, showing that in response to exercise training, increased CRC of mitochondria is associated with increased SNO of connexin 43. However, the underlying mechanisms are not clear. Indeed, Soetkamp et al. [70] demonstrated in isolated mitochondria that increased SNO of connexin 43 by a NO-donor increases mtROS production. This is in line with our results, showing that mtROS production in response to antimycin A tended to be higher in Ex-Tr cardiomyocytes. However, in our study, the use of L-NAME to block NO production or of ascorbate to decompose SNO, unmasked higher mtROS production in Ex-Tr cells compared with Sed cardiomyocytes, showing that in Ex-Tr cells NO rather contributes to limit mtROS production. Interestingly, IR is associated with increased connexin 43 oxidation that is attenuated by ischemic pre-conditioning [67]. As we did not investigate whether SNO of connexin 43 contributes to prevent its irreversible oxidation, additional studies are needed to better understand the link between SNO of connexin 43, mtROS, and cardioprotection.

These results associated with the finding that IFM also were altered in the Ex-Tr group may suggest that SNO of connexin 43 alone is not sufficient to explain the cardioprotective effect of exercise training. Indeed, in line with previous studies using ischemic pre-conditioning or a NO-donor to protect the myocardium during IR [15, 16, 75], we found that several key proteins involved in cardiac injury during IR are S-nitrosylated in response to exercise training. Among the biological processes sensitive to NO level during reperfusion, excessive ROS production by the mitochondrial ETC is attenuated by ischemic pre-conditioning and NO donors [16]. Interestingly, it has been suggested that SNO of the NADH dehydrogenase 3 (ND3) subunit of mitochondrial complex I, which is considered as the key trigger of ROS overproduction during IR, could explain the cardioprotective effect of mitoSNO, a NO-donor that targets mitochondria [16]. Here, we did not identify the ND3 subunit among the proteins S-nitrosylated in response to exercise training, but we observed that several ETC proteins were S-nitrosylated, including NDUFA10 (a complex I subunit), ETFDH, and CHCHD2 that connects metabolism to

**Fig. 6** Effect of exercise training on the electrocardiography profile and cardiac ROS production during in vivo ischemia–reperfusion in rats: a major role for NO. **a** Representative ECG recording before (baseline) and during ischemia (30 min) and reperfusion (10 min) in sedentary (Sed) and exercised (Ex-Tr) rats pre-treated by intraperitoneal injection of vehicle (NaCl 0.9%) or L-NAME (LN; 50 mg/kg in 0.9% NaCl) 24 h and 30 min before coronary artery ligation. **b** QTc values recorded at baseline in Sed and Ex-Tr animals pre-treated with NaCl (0.9%) or L-NAME (LN; 50 mg/kg in 0.9% NaCl). **c** QTc values recorded after 10 min of reperfusion in Sed and Ex-Tr animals pre-treated with NaCl (0.9%) or L-NAME (LN; 50 mg/kg in 0.9% NaCl). Dotted line represents the mean QTc interval in Sed rats at baseline. QTc was measured in 3–4 animals/group. **d** Determination of ROS production by DHE staining after 10 min of post-ischemic reperfusion in vivo, in hearts of Sed and Ex-Tr animals pre-treated or not with L-NAME (LN; 50 mg/kg in 0.9% NaCl) 24 h and 30 min before coronary artery ligation. Scale bar = 100  $\mu$ m. The ischemic area was collected and embedded in OCT and flash-frozen in liquid nitrogen. DHE fluorescence intensity was quantified in 20 images from 3–4 hearts/group. \* $p < 0.05$  Ex-Tr vs Sed, # $p < 0.05$  with vs without L-NAME (parametric one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparisons' test). Data are the mean  $\pm$  SEM



apoptosis [44]. In agreement, pre-incubation with ascorbate or with L-NAME increased mtROS production in Ex-Tr but not in Sed cardiomyocytes. Similarly, perfusion of isolated hearts or treatment of animals with L-NAME before IR increased cardiac ROS production during early reperfusion, suggesting that NO–SNO-mediated regulation of key ETC proteins can contribute to limit ROS overproduction during IR. Among the other proteins that could explain exercise training cardioprotection, we also identified SNO of cyclophilin D. This protein is a key regulator of mPTP and highly redox-sensitive. During ischemia, the rise in mitochondrial

calcium leads to cyclophilin D deacylation, its oxidation, and mPTP activation [1, 53]. SNO of cyclophilin D might contribute to cardioprotection by inhibiting its oxidation on cysteine 202 [1, 53]. In agreement, we found that exercise training increased cyclophilin D SNO on this cysteine residue, which was associated with the delayed activation of mPTP in response to  $Ca^{2+}$ .

Our in vitro and ex vivo results support the hypothesis that eNOS re-localization to mitochondria explains the effect of exercise training on mtROS and mPTP opening during IR. In line, the eNOS–NO pathway plays a key role

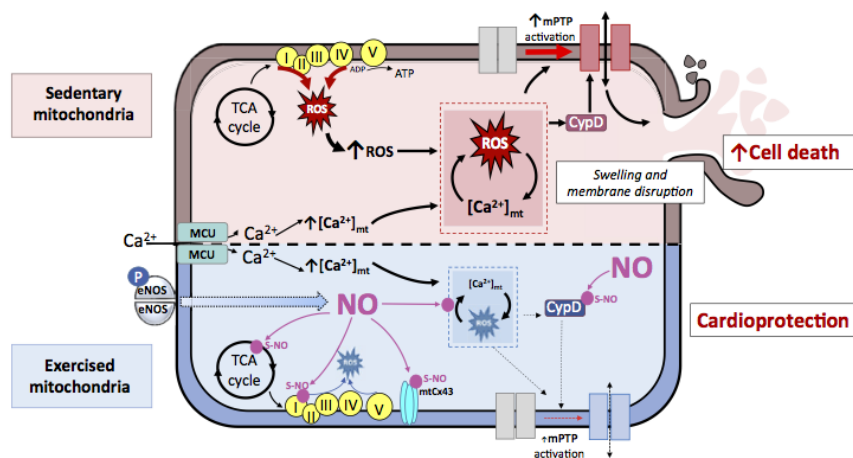


in exercise-induced cardioprotection [23][23]. Indeed, in animals that lack the gene encoding eNOS [10, 28] or the gene encoding  $\beta$ 3-adrenergic receptor [10] and in which exercise-induced phosphorylation (and thus activation) of eNOS is abolished, exercise training does not reduce myocardial infarct size. This is also observed when eNOS is pharmacologically inhibited [23]. Using the QTc interval as an index of heart sensitivity to IR, we confirmed in vivo that exercise training is associated with cardioprotection and that its beneficial effect is abolished by pre-treatment with L-NAME to reduce NO production and SNO level [40]. We also confirmed in vivo results we obtained in cardiac cells and isolated hearts showing that the eNOS-NO pathway plays a key role in ROS modulation during IR. Our results on mPTP activation are less clear-cut. Indeed, exercise delayed mPTP activity in isolated mitochondria. Conversely, in vivo we did not observe any difference of mitochondrial permeability after 10 min of reperfusion between Sed and Ex-Tr hearts. The effect of exercise training on mPTP was previously described in isolated mitochondria [46] and cardiac tissue after 45 min of reperfusion of isolated hearts [39]. Such discrepancy could be explained by the time when we measured mitochondrial permeability. Indeed, Panel et al. [58], using the same method (i.e., calcein-cobalt staining) in isolated cardiomyocytes subjected to anoxia reoxygenation, found that approximately 25 min are necessary to observe marked alterations of mitochondrial permeability. In addition, considering the key role of ROS on mPTP activation, we can also hypothesize that the effects of exercise on mPTP are secondary to the modulation of ROS production and, consequently, are observed later. More studies are necessary to precisely understand the impact of exercise training on mPTP activation during IR. Nevertheless, our in vivo results support the key role of NO in the modulation of mPTP activation during reperfusion, because L-NAME pre-treatment tended to reduce calcein fluorescence in Sed and slightly more in Ex-Tr hearts. This is in line with previous studies, showing that incubation of isolated mouse fibroblasts with GSNO improves mitochondrial CRC in conditions mimicking reperfusion [53] and treatment with the mitochondrial NO-donor mitoSNO can protect the mouse heart during IR [16]. Altogether, these results reinforce the hypothesis that the NO-SNO pathway plays a key role in protecting mitochondria during IR, and help to understand that the re-localization of this pathway to mitochondria following exercise training contributes to the exercise-induced cardioprotection.

## Study limitations

This study has some limitations. The first limitation concerns the purity of our mitochondrial preparations. As SNO is a very labile post-translational protein modification [75], we did not isolate mitochondrial subfractions using Percoll gradient ultracentrifugation. Indeed, mitochondrial proteins can become oxidated during isolation of mitochondria using a discontinuous Percoll gradient [14]. Therefore, we cannot rule out the possibility that the SNO of other proteins also contribute to modulate mPTP activation and ROS production in mitochondria. Indeed, we also observed the SNO of key proteins involved in calcium homeostasis (RyR2) and in the cell metabolic response (AMPK $\alpha$ 1). The list of all proteins in which SNO is influenced by exercise training is available in the online Suppl Table 1. We quantitatively evaluated the purity of our mitochondrial preparations after shotgun proteomics by comparing the summed abundance of all mitochondrial proteins, identified using MitoMiner (mitominer.mrc-mbu/cam.ac.uk), to the total protein abundance. We found a mitochondrial protein enrichment of  $81.8 \pm 0.021\%$ , with a variation coefficient of 2.7% between samples. The second limitation concerns the isolation of IFM that requires the use of proteases, leading to artifacts in mitochondrial protein quantification [36]. This can be particularly important for eNOS, because this protein is docked to the outer mitochondrial membrane through a proteinase cleavable peptide [25]. Therefore, we chose to evaluate eNOS level in the IFM + myofibrillar fraction to avoid the use of proteases. The results we obtained by western blotting were supported by the increased NO production, measured by DAF2-DA fluorescence, in the IFM from isolated Ex-Tr cardiomyocytes. However, when IFM were isolated using proteinase (i.e., nargase) to evaluate the CRC, we observed that NO-SNO signaling appeared to be less evident compared with SSM. Thus, more studies are needed to thoroughly investigate eNOS translocation to IFM and its functional consequences.

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 eNOS role in exercise-induced cardioprotection and bring evidence to support the hypothesis that cardioprotection by exercise training is explained by the re-localization of eNOS/NO/SNO cardioprotective signaling to mitochondria (Fig. 7). Additional studies are needed to better understand how each specific target contributes to limit mitochondrial ROS production and mPTP activation during IR.



**Fig. 7** Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection. During reperfusion, in sedentary hearts, the rapid re-establishment of OX-PHOS and mitochondrial membrane potential associated with mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload results in a strong rise in ROS production in mitochondria. A complex interplay between ROS production and  $\text{Ca}^{2+}$  overload triggers mPTP opening, leading to mitochondrial swelling and disruption, and cell death. Exercise training increases eNOS association

with mitochondria, leading to increased mitochondrial NO bioavailability. This results in SNO of key proteins involved in the mitochondrial respiratory function, electron transport, and regulation of mPTP opening. This contributes to blunt the interplay between ROS production and  $\text{Ca}^{2+}$  overload that triggers mPTP opening during ischemia–reperfusion. Altogether, these results support the hypothesis that cardioprotection by exercise training is explained by the re-localization of eNOS/NO/SNO cardioprotective signaling to mitochondria

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00906-3>.

**Author contributions** Conception, hypothesis definition, and study design: CR, GM, GC, JA, and DB; data acquisition, analysis, and interpretation: DB, MD, SG, JCG, BA-B, and CR; article writing, DB and CR.

**Funding** This work was supported by a PhD grant to D.B. from SFR Tersys and by a PhD mobility grant to D.B. from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire. This work is part of the NITROSOCARD project funded by the ANR (ANR-21-CE14-0058).

**Availability of data and materials (data transparency)** Proteomic data are available via ProteomeXchange with the dataset identifier with identifier PXD023515.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflict of interest.

## References

- Amanakis G, Sun J, Fergusson MM, McGinty S, Liu C, Molkentin JD, Murphy E (2021) Cysteine 202 of cyclophilin D is a site of multiple post-translational modifications and plays a role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa053>
- Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang S-J, Katz A, Westerblad H (2011) Mitochondrial production of

reactive oxygen species contributes to the  $\beta$ -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol* 589:1791–1801. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202838>

- Bassot A, Chauvin M-A, Bendridi N, Ji-Cao J, Vial G, Monnier L, Bartosch B, Alves A, Cottet-Rousselle C, Gouriou Y, Rieusset J, Morio B (2019) Regulation of mitochondria-associated membranes (MAMs) by NO/sGC/PKG participates in the control of hepatic insulin response. *Cells* 8:E1319. <https://doi.org/10.3390/cells811319>
- Boengler K, Ruiz-Meana M, Gent S, Ungefug E, Soetkamp D, Miro-Casas E, Cabestrero A, Fernandez-Sanz C, Semenzato M, Lisa FD, Rohrbach S, Garcia-Dorado D, Heusch G, Schulz R, Mercola M (2012) Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption. *J Cell Mol Med* 16:1649–1655. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01516.x>
- Bøtker HE, Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Heusch G, Ovize M (2020) Translational issues for mitoprotective agents as adjunct to reperfusion therapy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 24:2717–2729. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14953>
- Boulghobra D, Coste F, Geny B, Reboul C (2020) Exercise training protects the heart against ischemia–reperfusion injury: a central role for mitochondria? *Free Radic Biol Med* 152:395–410. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.005>
- Boulghobra D, Grillet P-E, Laguerre M, Tenon M, Fauconnier J, Faça-Berthon P, Reboul C, Cazorla O (2020) Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes. *Redox Biol* 34:101554. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101554>
- Burwell LS, Brookes PS (2007) Mitochondria as a target for the cardioprotective effects of nitric oxide in ischemia–reperfusion injury. *Antioxid Redox Signal* 10:579–600. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1845>



9. Cadenas S (2018) ROS and redox signaling in myocardial ischemia–reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med* 117:76–89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024>
10. Calvert JW, Condit ME, Pablo AJ, Nicholson CK, Moody BF, Hood RL, Sindler AL, Susheel G, Seals DR, Barouch LA, Lefer DJ (2011) Exercise protects against myocardial ischemia–reperfusion injury via stimulation of  $\beta_3$ -adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ Res* 108:1448–1458. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241117>
11. Carvalho PC, Yates JR, Barbosa VC (2012) Improving the TFCM test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28:1652–1654. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts247>
12. Casin KM, Fallica J, Mackowski N, Veenema RJ, Chan A, St. Paul A, Zhu G, Bedja D, Biswal S, Kohr MJ (2018) S-Nitrosoglutathione reductase is essential for protecting the female heart from ischemia–reperfusion injury. *Circ Res* 123:1232–1243. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313956>
13. Cazorla O, Szilagyi S, Le Guennec J-Y, Vassort G, Lacampagne A (2005) Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J* 19:88–90. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2066fje>
14. Chang AHK, Sancheti H, Garcia J, Kaplowitz N, Cadenas E, Han D (2014) Respiratory substrates regulate S-nitrosylation of mitochondrial proteins through a thiol-dependent pathway. *Chem Res Toxicol* 27:794–804. <https://doi.org/10.1021/tx400462r>
15. Chouchani ET, James AM, Methner C, Pell VR, Prime TA, Erickson BK, Forkink M, Lau GY, Bright TP, Menger KE, Fearnley IM, Krieg T, Murphy MP (2017) Identification and quantification of protein S-nitrosylation by nitrite in the mouse heart during ischemia. *J Biol Chem* 292:14486–14495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798744>
16. Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, James AM, Cochemé HM, Reinhold J, Lilley KS, Partridge L, Fearnley IM, Robinson AJ, Hartley RC, Smith RAJ, Krieg T, Brookes PS, Murphy MP (2013) Cardioprotection by S-nitrosylation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med* 19:753–759. <https://doi.org/10.1038/nm.3212>
17. Costa ADT, Pierre SV, Cohen MV, Downey JM, Garlid KD (2008) cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria. *Cardiovasc Res* 77:344–352. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm050>
18. Costa Alexandre DT, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD (2005) Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 97:329–336. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000178451.08719.5b>
19. Dedkova EN, Blatter LA (2009) Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase. *J Physiol* 587:851–872. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165423>
20. Doulias P-T, Tenopoulou M, Greene JL, Raju K, Ischiropoulos H (2013) Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation. *Sci Signal* 6:rs1. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003252>
21. Ejlersen H, Andersen ZJ, von Euler-Chelpin MC, Johansen PP, Schnohr P, Prescott E (2017) 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. <https://doi.org/10.1177/2047487317702046>
22. Erusalimsky JD, Moncada S (2007) Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2524–2531. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151167>
23. Farah C, Kleindienst A, Bolea G, Meyer G, Gayraud S, Geny B, Obert P, Cazorla O, Tanguy S, Reboul C (2013) Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res Cardiol* 108:389. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0389-2>
24. Fauconnier J, Andersson DC, Zhang S-J, Lanner JT, Wibom R, Katz A, Bruton JD, Westerblad H (2007) Effects of palmitate on  $Ca^{2+}$  handling in adult control and ob/ob cardiomyocytes: impact of mitochondrial reactive oxygen species. *Diabetes* 56:1136–1142. <https://doi.org/10.2337/db06-0739>
25. Gao S, Chen J, Brodsky SV, Huang H, Adler S, Lee JH, Dhawal N, Cohen-Gould L, Gross SS, Goligorsky MS (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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308504200>
26. García-Niño WR, Correa F, Rodríguez-Barrena JI, León-Contreras JC, Buelna-Chontal M, Soria-Castro E, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Zazueta C (2017) Cardioprotective kinase signaling to subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria is mediated by caveolar structures. *Basic Res Cardiol* 112:15. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0607-4>
27. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox Biol* 6:260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
28. Guo Y, Li Q, Xuan Y-T, Wu W-J, Tan W, Slezak J, Zhu X, Tomlin A, Bolli R (2021) Exercise-induced late preconditioning in mice is triggered by eNOS-dependent generation of nitric oxide and activation of PKCe and is mediated by increased iNOS activity. *Int J Cardiol* 340:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2021.08.021>
29. Heinzl FR, Luo Y, Li X, Boengler K, Buechert A, García-Dorado D, Di Lisa F, Schulz R, 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. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000181171.65293.65>
30. Heusch G (2020) Myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol* 17(12):773–789. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0403-y>
31. Jaffrey SR, Snyder SH (2001) The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 200:pl1. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.86.pl1>
32. Klein G, Mathé C, Biola-Clier M, Devineau S, Drouineau E, Hatem E, Marichal L, Alonso B, Gaillard J, Lagniel G, Armengaud J, Carrière M, Chédin S, Boulard Y, Pin S, Renault J, Aude J, Labarre J (2016) RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. In: *Nanotoxicology*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/27705051/>. Accessed 2 Dec 2020
33. Kleindienst A, Battault S, Belaidi E, Tanguy S, Rosselin M, Boulghobra D, Meyer G, Gayraud S, Walther G, Geny B, Durand G, Cazorla O, Reboul C (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. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0559-0>
34. Kohr M, Aponte A, J S, Gucek M, Steenbergen C, Murphy E (2012) Measurement of S-nitrosylation occupancy in the myocardium with cysteine-reactive tandem mass tags: short communication. In: *Circulation research*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/22865876/>. Accessed 8 Nov 2020
35. Kohr MJ, Aponte AM, Sun J, Wang G, Murphy E, Gucek M, Steenbergen C (2011) Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1327–1335. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00997.2010>



36. Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Ferdinandy P, Schulz R, Giricz Z, Boengler K (2018) Nagars treatment of cardiac subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria leads to artefacts in mitochondrial protein quantification. *J Pharmacol Toxicol Methods* 91:50–58. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.01.004>
37. Kuznetsov AV, Margreiter R (2009) Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci* 10:1911–1929. <https://doi.org/10.3390/ijms10041911>
38. Lacza Z, Pankotai E, Busija DW (2009) Mitochondrial nitric oxide synthase: current concepts and controversies. *Front Biosci Landmark Ed* 14:4436–4443
39. Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, Powers SK (2012) Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia–reperfusion injury. *Med Sci Sports Exerc* 44:397–405. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318231c037>
40. Leite ACR, Oliveira HCF, Utino FL, Garcia R, Alberici LC, Fernandes MP, Castilho RF, Vercesi AE (2010) Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenergy* 1797:1210–1216. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.034>
41. Lemasters J, Theruvath T, Zhong Z, Ai N (2009) Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death. In: *Biochimica Biophysica Acta*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/19576166/>. Accessed 8 Nov 2020
42. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS (2010) S-Nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res* 106:633–646. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.207381>
43. Lindenmayer G, Sordahl L, Schwartz A (1968) Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. In: *Circulation research* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/5676454/>. Accessed 2 Dec 2020
44. Liu Y, Zhang Y (2015) CHCHD2 connects mitochondrial metabolism to apoptosis. *Mol Cell Oncol*. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1004964>
45. Magalhães J, Gonçalves IO, Lumini-Oliveira J, Marques-Aleixo I, Passos E, Rocha-Rodrigues S, Machado NG, Moreira AC, Rizo D, Viscor G, Oliveira PJ, Torrella JR, Ascensão A (2014) Modulation of cardiac mitochondrial permeability transition and apoptotic signaling by endurance training and intermittent hypobaric hypoxia. *Int J Cardiol* 173:40–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.02.011>
46. Marcil M, Bourduas K, Ascah A, 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. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00913.2005>
47. Marongiu E, Crisafulli A (2014) Cardioprotection acquired through exercise: the role of ischemic preconditioning. *Curr Cardiol Rev* 10:336–348. <https://doi.org/10.2174/1573403X10666140404110229>
48. McMillin-Wood J, Wolkowicz PE, Chu A, Tate CA, Goldstein MA, Entman ML (1980) Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenergy* 591:251–265. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(80\)90157-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(80)90157-7)
49. Methner C, Lukowski R, Grube K, Loga F, Smith RAJ, Murphy MP, Hofmann F, Krieg T (2013) Protection through preconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res Cardiol* 108:337. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0337-1>
50. Meziat C, Boulghobra D, Strock E, Battault S, Bornard I, Walther G, 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. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.02.009>
51. Murphy E, Kohr M, Sun J, Nguyen T, Steenbergen C (2012) S-Nitrosylation: a radical way to protect the heart. *J Mol Cell Cardiol* 52:568–577. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.08.021>
52. Murphy E, Steenbergen C (2007) Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol* 69:51–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.163645>
53. Nguyen TT, Stevens MV, Kohr M, Steenbergen C, Sack MN, 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.243469>
54. Olgar Y, Degirmenci S, Durak A, Billur D, Can B, Kayki-Mutlu G, Arioglu-Inan EE, Turan B (2018) Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Exp Gerontol* 110:172–181. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.06.012>
55. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1977) Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* 252:8731–8739
56. Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1986) Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 250:H741–H748. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.250.5.H741>
57. Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU). *Nat Cell Biol* 15:1464–1472. <https://doi.org/10.1038/ncb2868>
58. Panel M, Ghaleh B, Morin D (2017) Ca<sup>2+</sup> ionophores are not suitable for inducing mPTP opening in murine isolated adult cardiac myocytes. *Sci Rep* 7:4283. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04618-4>
59. Penna C, Angotti C, Pagliaro P (2014) Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. *Exp Biol Med* 239:647–662. <https://doi.org/10.1177/1535370214522935>
60. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu D, Inuganti A, Griss J, Mayer G, Eisenacher M, Pérez E, Uszkoreit J, Pfeuffer J, Sachsenberg T, Yilmaz S, Tiwary S, Cox J, Audain E, Walzer M, Jarnuczak A, Ternent T, Brazma A, Vizcaíno J (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. In: *Nucleic acids research*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/30395289/>. Accessed 22 Jan 2021
61. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M (2014) Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res* 114:1601–1610. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303822>
62. Reboul C, Tanguy S, Juan JM, Dauzat M (1985) 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* 98:83–92. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00214.2004>
63. Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C (2005) Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H868–H872. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00866.2004>
64. Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Denuc A, García-Dorado D (2018) Mitochondrial Cx43, an important component of cardiac preconditioning. *Biochim Biophys Acta BBA Biomembr* 1860:174–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.011>
65. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao K-A (2017) mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data

- integration. *PLoS Comput Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005752>
66. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, Ahmed M, Aksut B, Alam T, Alam K, Alla F, Alvis-Guzman N, Amrock S, Ansari H, Ärnlöv J, Asayesh H, Atey TM, Avila-Burgos L, Awasthi A, Banerjee A, Barac A, Bärnighausen T, Barregard L, Bedi N, Belay Ketema E, Bennett D, Berhe G, Bhutta Z, Bitew S, Carapetis J, Carrero JJ, Malta DC, Castañeda-Orjuela CA, Castillo-Rivas J, Catalá-López F, Choi J-Y, Christensen H, Cirillo M, Cooper L, Criqui M, Cundiff D, Damasceno A, Dandona L, Dandona R, Davletov K, Dharmaratne S, Dorairaj P, Dubey M, Ehrenkrantz R, El Sayed ZM, Faraon EJA, Esteghamati A, Farid T, Farvid M, Feigin V, Ding EL, Fowkes G, Gebrehiwot T, Gillum R, Gold A, Gona P, Gupta R, Habtewold TD, Hafezi-Nejad N, Hailu T, Hailu GB, Hankey G, Hassen HY, Abate KH, Havmoeller R, Hay SI, Horino M, Hotez PJ, Jacobsen K, James S, Javanbakht M, Jeemon P, John D, Jonas J, Kalkonde Y, Karimkhani C, Kasaeian A, Khader Y, Khan A, Khang Y-H, Khera S, Khoja AT, Khubchandani J, Kim D, Kolte D, Kosen S, Krohn KJ, Kumar GA, Kwan GF, Lal DK, Larsson A, Linn S, Lopez A, Lotufo PA, El Razek HMA, Malekzadeh R, Mazidi M, Meier T, Meles KG, Mensah G, Meretoja A, Mezgebe H, Miller T, Mirrakhimov E, Mohammed S, Moran AE, Musa KI, Narula J, Neal B, Ngalesoni F, Nguyen G, Obermeyer CM, Owolabi M, Patton G, Pedro J, Qato D, Qorbani M, Rahimi K, Rai RK, Rawaf S, Ribeiro A, Safiri S, Salomon JA, Santos I, Santric Milicevic M, Sartorius B, Schutte A, Sepanlou S, Shaikh MA, Shin M-J, Shishehbor M, Shore H, Silva DAS, Sobngwi E, Stranges S, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tadele Atnafu N, Tesfay F, Thakur JS, Thrift A, Topor-Madry R, Truelsen T, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Üthman O, Vasankari T, Vlassov V, Vollset SE, Wakayo T, Watkins D, Weintraub R, Werdecker A, Westerman R, Wiyongse CS, Wolfe C, Workicho A, Xu G, Yano Y, Yip P, Yonemoto N, Younis M, Yu C, Vos T, Naghavi M, Murray C (2017) Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* 70:1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>
  67. 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, García-Dorado D (2014) Ischemic preconditioning protects cardiomyocyte mitochondria through mechanisms independent of cytosol. *J Mol Cell Cardiol* 68:79–88. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.001>
  68. Sartoretto JL, Kalwa H, Pluth MD, Lippard SJ, Michel T (2011) Hydrogen peroxide differentially modulates cardiac myocyte nitric oxide synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 108:15792–15797. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111331108>
  69. Schulman IH, Hare JM (2012) Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation. *Biochim Biophys Acta* 1820:752–762. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.002>
  70. Soetkamp D, Nguyen TT, Menazza S, Hirschhäuser C, Hendgen-Cotta UB, Rassaf T, Schlüter KD, Boengler K, Murphy E, Schulz R (2014) S-nitrosation of mitochondrial connexin 43 regulates mitochondrial function. *Basic Res Cardiol* 109:433. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0433-x>
  71. Srisakuldee W, Makazan Z, Nickel BE, Zhang F, Thliveris JA, Pasumarthi KBS, 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. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu066>
  72. Sun J, Kohr MJ, Nguyen T, Aponte AM, Connelly PS, Esfahani SG, Gucek M, Daniels MP, Steenbergen C, Murphy E (2012) Disruption of caveolae blocks ischemic preconditioning-mediated S-nitrosylation of mitochondrial proteins. *Antioxid Redox Signal* 16:45–56. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3844>
  73. Sun J, Morgan M, Shen R-F, Steenbergen C, Murphy E (2007) Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. *Circ Res* 101:1155–1163. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.155879>
  74. Sun J, Murphy E (2010) Protein S-nitrosylation and cardioprotection. *Circ Res* 106:285–296. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209452>
  75. Sun J, Nguyen T, Aponte AM, Menazza S, Kohr MJ, Roth DM, Patel HH, Murphy E, Steenbergen C (2015) Ischaemic preconditioning preferentially increases protein S-nitrosylation in subsarcolemmal mitochondria. *Cardiovasc Res* 106:227–236. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv044>



## Article annexe n°2

---

Initialement, les objectifs de ma thèse étaient (i) d'investiguer les mécanismes sous-jacents expliquant l'augmentation de la sensibilité du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie et (ii) d'évaluer si l'exercice physique permettait de limiter les effets délétères de l'hyperglycémie. Finalement, suite au premier comité de suivi de thèse, nous avons décidé de centrer la thèse uniquement sur le premier objectif, à savoir l'impact de l'hyperglycémie sur la sensibilité du cœur à l'IR, afin d'assurer la faisabilité temporelle du projet de thèse. Néanmoins, afin de valoriser des résultats obtenus au cours des premiers mois de thèse, nous avons décidé d'écrire une « short-communication » intitulée « Exercise training limits mitochondrial fission during myocardial ischemia-reperfusion », actuellement soumise dans *Journal of General Physiology* (JGP).

### **Contexte scientifique et hypothèse :**

Parmi les stratégies naturelles connues pour réduire les lésions d'IR, l'exercice physique est aujourd'hui décrit comme l'une des plus efficaces. Récemment, notre laboratoire (Boulghobra et al., 2021) ainsi que d'autres (Lee et al., 2012) ont rapporté que les effets cardioprotecteurs de l'exercice physique pouvaient être expliqués par son impact sur la production d'EROMt et l'activation du mPTP au cours des premières minutes de reperfusion. Considérant le rôle clé de la fission mitochondriale dans les lésions d'IR et l'interaction complexe entre EROmt/[Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> et dynamique mitochondriale, nous avons supposé un potentiel impact de l'exercice physique sur la dynamique mitochondriale au cours de l'IR. Dans la littérature scientifique, il a été rapporté que l'exercice physique favorise la fusion mitochondriale au niveau du muscle squelettique (Huertas et al., 2019) tandis qu'au niveau cardiaque, la fission mitochondriale a été rapportée comme une réponse normale à la demande énergétique accrue pendant l'exercice (Coronado et al., 2018). Cependant, l'impact de l'exercice physique sur le remodelage du réseau mitochondrial au cours d'un stress tel que l'IR reste à investiguer. À notre connaissance, une seule étude a rapporté un effet de l'exercice physique sur la dynamique mitochondriale pendant l'IR (Ghahremani et al., 2018). Néanmoins, bien que les auteurs suggèrent une augmentation de la fusion mitochondriale post-IR chez le groupe entraîné, seul le niveau d'expression génique de protéines impliquées dans la fission et fusion mitochondriale a été mesuré dans cette étude, ne permettant pas de conclure d'un réel impact de l'exercice physique sur la dynamique mitochondriale au cours du l'IR. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail consistait à évaluer si l'exercice physique pouvait limiter les effets délétères de l'IR sur la dynamique mitochondriale.

## **Résultats majeurs**

Ces travaux ont permis de montrer, via des techniques de biochimie et de microscopie électronique à transmission, que l'exercice physique permet de limiter la fission mitochondriale au cours de la reperfusion. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la cardioprotection par l'exercice pourrait être expliquée par une diminution de la fission excessive cardiaque en réponse à l'IR.

**Article soumis dans *Journal of General Physiology (JGP)* le 07/09/2023**

## **Exercise training limits mitochondrial fission during myocardial ischemia-reperfusion**

Mathilde Dubois<sup>1</sup>, Doria Boulghobra<sup>1\*</sup>, Florian Pallot<sup>1\*</sup>, Florence Coste<sup>1</sup>, Guillaume Walther<sup>1</sup>, Gregory Meyer<sup>1</sup>, Isabelle Bornard<sup>2</sup>, Cyril Reboul<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> UR407 INRAE Pathologie Végétale, INRAE, 84140, Avignon, France.

\*, both authors equally contributed to this work

Words count: 1291

Short title: Cardiac mitochondrial fission and exercise training

### **CORRESPONDING AUTHOR**

**Dr Cyril Reboul**

Laboratoire de Physiologie Expérimentale Cardiovasculaire – UPR-4278

UFR Sciences Technologies Santé, Centre INRAE - Site Agroparc

228 route de l'Aérodrome, 84914 AVIGNON Cedex9

Phone: +33 490162946

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



## 1. Introduction

Acute myocardial infarction is a leading cause of death worldwide. Reperfusion of the ischemic area is the current standard therapy. However, it results in important heart cell dysfunctions, known as ischemic reperfusion (IR) injuries. In the past decade, the key role of mitochondria in IR injuries has been highlighted [1]. During early reperfusion, mitochondrial network disruption, defined as the imbalance between mitochondrial fusion and fission, has emerged as a new relevant factor to explain the heart vulnerability to IR [2]. Indeed, inhibition of cardiac mitochondrial fission during IR using mitochondrial division inhibitor-1 (mdivi-1) delays the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), limits mitochondrial ROS overproduction [3] and reduces infarct size [4].

Among the strategies known to reduce IR injuries, physical activity has been much studied [5]. Recently, we [6] and others [7] reported that the cardioprotective effect of exercise training (ExTr) could be explained by its impact on mitochondrial ROS production and mPTP activation during early reperfusion. It was previously reported that mitochondrial fission is a normal heart response to increased energy demand during exercise [8]. Conversely, it is not known whether ExTr can influence the mitochondrial network during IR. To the best of our knowledge, only one study focused on ExTr effect on the mitochondrial network during IR [9]. However, as this study only monitored the gene expression level of proteins involved in mitochondrial fission regulation, the results are inconclusive.

Therefore, we investigated whether ExTr in rats modulate IR deleterious impact on the mitochondrial network. Using western blotting and transmission electron microscopy, we reported for the first time that ExTr limited the impact of cardiac IR on mitochondrial fission.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animal model

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee (N° CEEA-00223, #27001). Male Wistar rats (12-week-old; weight = 225-275 g, Janvier, France) were assigned to the sedentary (Sed) or exercise-trained (ExTr) group, as previously described [5].

### 2.2. Ischemia-reperfusion (IR) on isolated perfused hearts

IR was performed on a Langendorff apparatus, as previously described [5]. Briefly, after stabilization, a global ischemia was performed for 25 min followed by 10 min of reperfusion. The left ventricular (LV) pressure (MP36R, BioPac System Inc) was recorded during the entire perfusion and the cardiac functional recovery following IR was determined. LV tissues were flash-frozen in liquid nitrogen for biochemical experiments or fixed in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in a sodium cacodylate buffer (0.1M) for electron microscopy analysis.

### 2.3. Western blotting

Western blotting was performed as previously described [6]. Mitochondrial proteins were separated on polyacrylamide-SDS gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked and incubated at 4°C with primary antibodies against dynamin-like protein 1 (DRP1) (1:1000, Cell Signaling), DRP1 phosphorylated on S616 (1:500, Cell Signaling), DRP1 phosphorylated on S637 (1:1000, Cell Signaling), mitofusin 2 (MFN2) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), and voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1) (1:30 000, Cell Signaling). Immunodetection was carried out using the ECL chemiluminescence system (VILBER Fusion FX).

### 2.4. Transmission electron microscopy

Left ventricular samples from perfused hearts were washed and fixed in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer. After rinsing, samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1h, dehydrated through a graded ethanol series, and embedded in resin. Ultrathin heart tissue sections were prepared with a diamond knife and a Reichert Ultracut E ultramicrotome and stained with uranyl acetate and lead citrate. Images were acquired using a transmission electron microscope (TEM-Hitachi H7800) by randomly selecting areas of longitudinally arranged cardiomyocytes.

### 2.5. Statistical analyses

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM or as median and interquartile range for the violin plots. Experimental conditions were compared with the Student's t test when data were normally distributed

(confirmed with the Shapiro–Wilk normality test). When necessary, non-parametric tests were used (Mann–Whitney test for two groups). A  $p < 0.05$  value was considered as statistically significant. Statistical analyses were done with GraphPad Prism (8.4.3).

### 3. Results and Discussion

To evaluate the impact of ExTr on mitochondrial fission during cardiac IR, we first confirmed the cardioprotective effect of 5 weeks of ExTr on heart vulnerability to IR. To this aim, we performed global ischemia followed by reperfusion on isolated perfused hearts (Langendorff apparatus) from Sed and ExTr rats. As previously reported by our group [5] and others [10], ExTr improved IR cardiac functional recovery (Fig.1 A-D), as indicated by the higher LV developed pressure (Pdev; Fig 1B) and LV contractility indexes (Fig.1 C-D). In addition, using exactly the same protocol (ExTr intensity and duration), we previously showed that this functional recovery improvement during early reperfusion is associated with reduced ROS production and infarct size [5]. Using this model, we next asked whether ExTr could prevent mitochondrial fission. Mitochondrial fission requires the activation and the translocation of the GTPase DRP1 from the cytosol to the mitochondria, and high DRP1 activation levels have been related to higher cardiac vulnerability to IR [11]. First, to confirm that our model of IR increases mitochondrial fission, we measured by western blotting total DRP1 and DRP1 phosphorylated on S616 (activation) and S637 (inhibition) in mitochondrial subfractions from hearts submitted or not to IR (Fig. 2 A-E). As previously reported [11][12], we confirmed that IR increased DRP1 level in the mitochondrial subfraction (Fig. 2C), suggesting translocation of DRP1 from cytosol to mitochondria during IR. Moreover, IR increased DRP1 activation, as indicated by the reduced level of DRP1 phosphorylated on S637 (inhibition) in IR hearts compared with controls (Fig. 2D) and the increase of DRP1 phosphorylated on S616 (activation) (Fig. 2E). Interestingly, when the same biochemical analyses were performed on the heart of ExTr animals submitted to the same IR procedure (Fig.3 A-E), we reported that the level of DRP1 phosphorylation on S616 (activation) in the mitochondrial subfraction was significantly reduced when compared to Sed hearts (Fig.3 D), while DRP1 level was not impacted (Fig.3 C). Finally, DRP1 phosphorylation on S637 (inhibition) tended to be higher in ExTr than Sed hearts after IR without reaching statistical significance (Fig.3 E). Next, we asked whether ExTr could influence the expression level of MFN2, a central regulator of mitochondrial fusion. We found that after IR, MFN2 level was increased in ExTr hearts compared with Sed hearts (Fig.3F-G), in line with the *Mfn2* gene expression data reported by the only study on ExTr effect on the mitochondrial network following IR [9]. This result could be of importance because MFN2 overexpression has been associated with protection of mitochondria during IR [13].

Considering these results obtained on signaling pathways involved in the regulation of mitochondrial fission, we next investigated the consequences of our experimental conditions on mitochondrial shape by transmission electron microscopy (Fig. 3 H-K). Compared to hearts that did not undergo IR (baseline), IR hearts were characterized by an increase in the mitochondrial area (Fig. 3 H-I) and a reduction of the cristae density (Fig.3 J). These, results were in line with previous reports [14], and strongly suggest mitochondrial swelling following IR. More interestingly, the analyses of the mitochondrial aspect ratio, which reflects the length to width ratio and is more independent of mitochondrial swelling to evaluate mitochondrial fragmentation, was strongly reduced following IR when compared to baseline (Fig.3K). It is also interesting to note that we did not observe elongated mitochondria in IR Sed hearts, while they were common in control samples (Fig.3 H). These results were in line with previous reports [11][12], showing that IR leads to excessive mitochondrial fission. Considering these results, we next evaluated the effect of ExTr on these parameters. We found that following IR, mitochondrial area and aspect ratio were higher in hearts from ExTr than Sed rats (Fig.3 I, K) with no significant impact on mitochondrial cristae density (Fig.3 J). In addition, we also observed more elongated mitochondria in ExTr than Sed hearts after IR (Fig.3 H). These observations support the hypothesis that the Exercise Trained heart is less prompt to mitochondrial fission during IR than the sedentary heart.

In conclusion, these results strongly support the hypothesis that ExTr pre-conditioning can reduce excessive mitochondrial fission in response to IR. As mitochondrial fission is considered a key trigger of IR injuries, our findings could contribute to understand how exercise protects the heart during IR. However, more studies are necessary to determine whether this phenomenon constitute or not a key trigger of exercise-induced cardioprotection.

#### **4. Disclosures**

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### **5. Authors contribution**

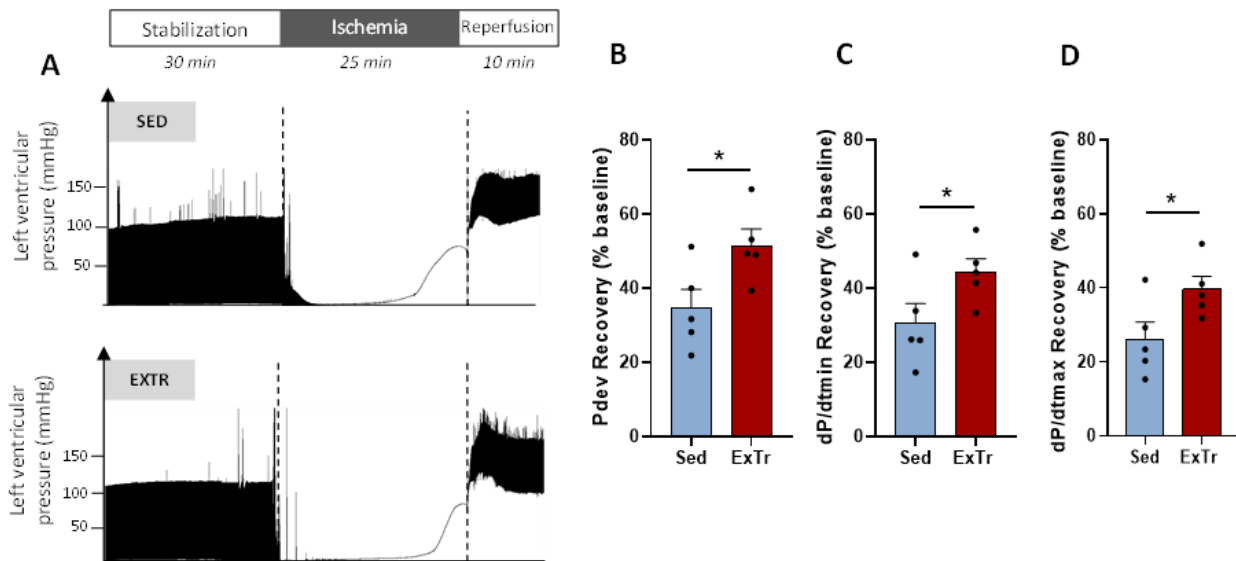
Conception, hypothesis definition, and study design: CR, GM, GW, FC, and MD; data acquisition, analysis, and interpretation: DB, MD, FP, IB, CR; article writing, MD, DB and CR.

## 6. Bibliography

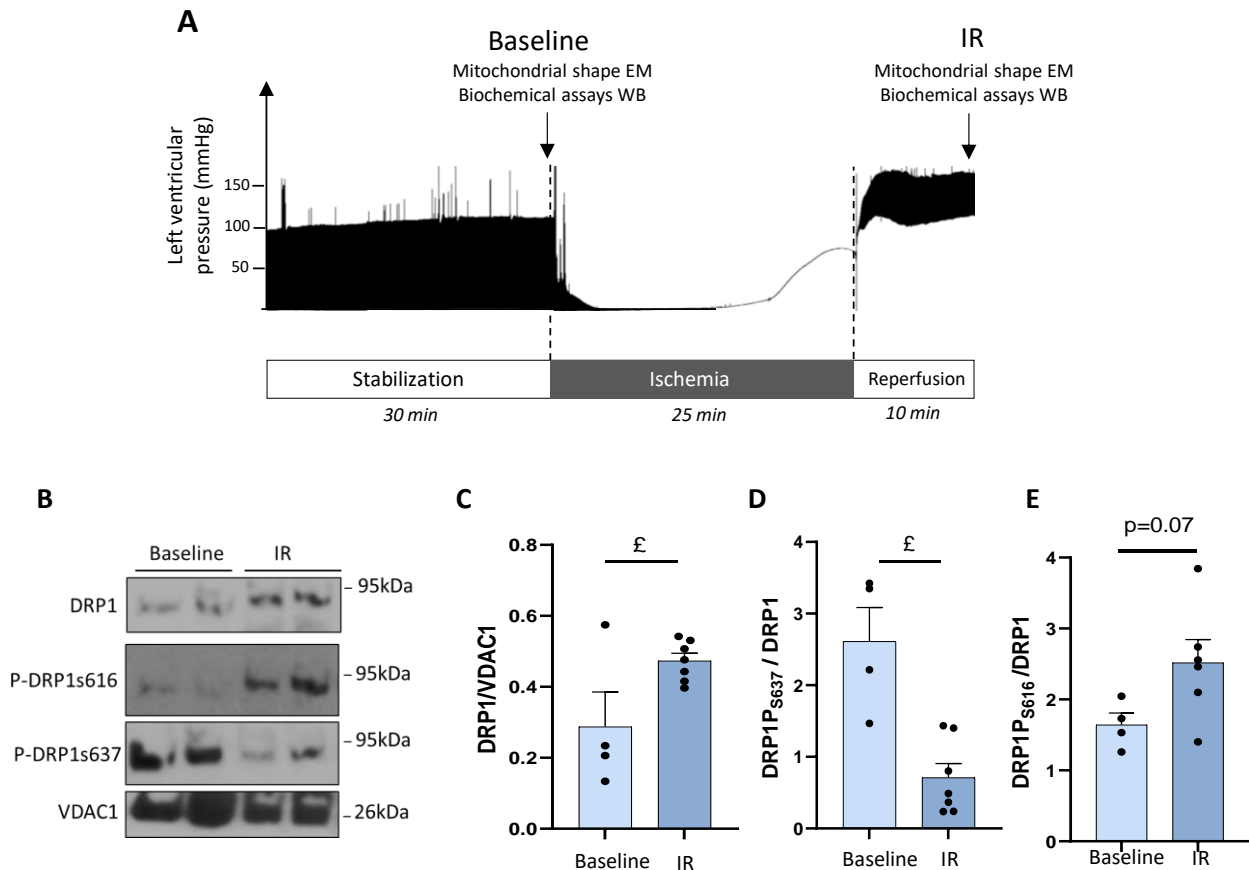
- [1] A. V. Kuznetsov, S. Javadov, R. Margreiter, M. Grimm, J. Hagenbuchner, et M. J. Ausserlechner, « The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury », *Antioxidants*, vol. 8, no 10, p. 454, oct. 2019, doi: 10.3390/antiox8100454.
- [2] C. Maneechote, S. Palee, S. C. Chattipakorn, et N. Chattipakorn, « Roles of mitochondrial dynamics modulators in cardiac ischaemia/reperfusion injury », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 21, no 11, p. 2643-2653, 2017, doi: 10.1111/jcmm.13330.
- [3] J. Ding et al., « Mdivi-1 alleviates cardiac fibrosis post myocardial infarction at infarcted border zone, possibly via inhibition of Drp1-Activated mitochondrial fission and oxidative stress », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 718, p. 109147, mars 2022, doi: 10.1016/j.abb.2022.109147.
- [4] S.-B. Ong, S. Subrayan, S. Y. Lim, D. M. Yellon, S. M. Davidson, et D. J. Hausenloy, « Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury », *Circulation*, vol. 121, no 18, p. 2012-2022, mai 2010, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906610.
- [5] C. Farah et al., « Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 108, no 6, p. 389, oct. 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0389-2.
- [6] D. Boulghobra et al., « Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection », *Basic Res. Cardiol.*, vol. 116, no 1, p. 66, déc. 2021, doi: 10.1007/s00395-021-00906-3.
- [7] Y. Lee et al., « Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury », *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 44, no 3, p. 397-405, mars 2012, doi: 10.1249/mss.0b013e318231c037.
- [8] M. Coronado et al., « Physiologic Mitochondrial Fragmentation Is a Normal Cardiac Adaptation to Increased Energy Demand », *Circ. Res.*, vol. 122, no 2, p. 282-295, janv. 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310725.
- [9] R. Ghahremani, A. Damirchi, I. Salehi, A. Komaki, et F. Esposito, « Mitochondrial dynamics as an underlying mechanism involved in aerobic exercise training-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury », *Life Sci.*, vol. 213, p. 102-108, nov. 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.035.
- [10] D. K. Bowles, R. P. Farrar, et J. W. Starnes, « Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 263, no 3, p. H804-H809, sept. 1992, doi: 10.1152/ajpheart.1992.263.3.H804.
- [11] M. Disatnik et al., « Acute Inhibition of Excessive Mitochondrial Fission After Myocardial Infarction Prevents Long-term Cardiac Dysfunction », *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 2, no 5, p. e000461, 2013, doi: 10.1161/JAHA.113.000461.
- [12] W. W. Sharp et al., « Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission », *FASEB J.*, vol. 28, no 1, p. 316-326, 2014, doi: 10.1096/fj.12-226225.
- [13] M. Liu, X. Li, et D. Huang, « Mfn2 Overexpression Attenuates Cardio-Cerebrovascular Ischemia-Reperfusion Injury Through Mitochondrial Fusion and Activation of the AMPK/Sirt3 Signaling », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, 2020, Consulté le: 30 mars 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.598078>

- [14] J. W. Elrod et al., « Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no 39, p. 15560-15565, sept. 2007, doi: 10.1073/pnas.0705891104.

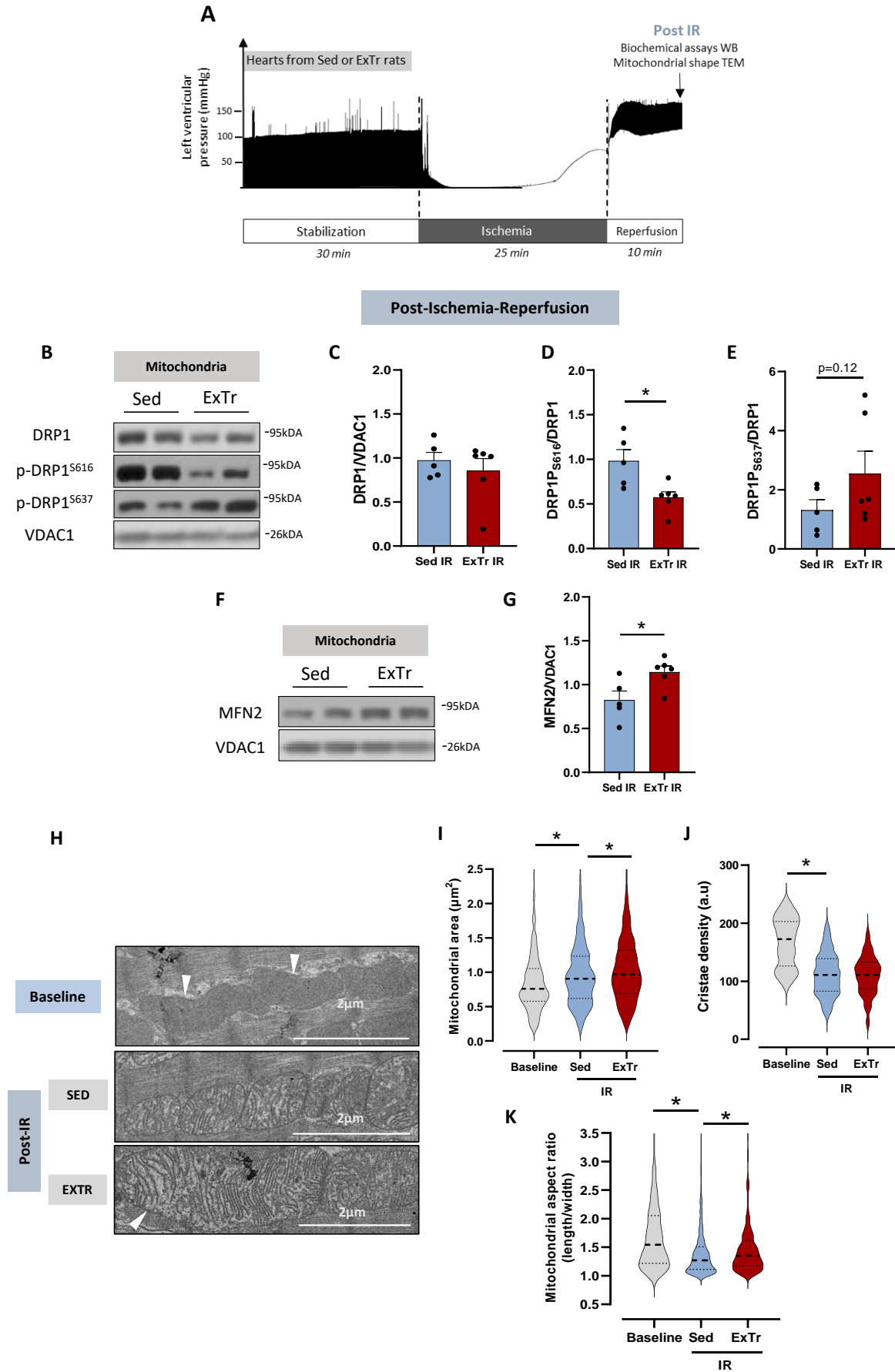




**Figure 1. Effect of exercise training (ExTr) on left ventricular heart function after ischemia-reperfusion (IR).** (A) Schematic illustration of the experimental protocol (upper panel). Hearts from Sedentary (Sed, n=5) and Exercised (ExTr, n=5) rats were stabilized for 30 min using a Langendorff apparatus. Then, hearts underwent global ischemia for 25 min followed by 10 min of reperfusion. Left ventricular (LV) pressure traces in the hearts of Sed (middle) and ExTr rats (lower panel) during the IR protocol. (B-D) Recovery of LV developed pressure (Pdev) (B), minimal (C) and maximal (D) first derivative pressure (dP/dtmin and dP/dtmax, respectively) after 10 min of post-ischemic reperfusion (\*p < 0.05 ExTr vs Sed; parametric *t* test; Data are the mean ± SEM).



**Figure 2. Effect of ischemia-reperfusion (IR) on mitochondrial dynamics.** (A) Schematic illustration of the experimental protocol. (B-E) IR impact on the DRP1-dependent mitochondrial fission pathway. Western blotting of isolated perfused hearts that underwent or not global no-flow ischemia (25 min) followed by 10 min of reperfusion (only sedentary animals were used). (B) Representative western blots showing phosphorylated DRP1 (p-DRP1<sup>Ser616</sup> and p-DRP1<sup>Ser637</sup>) and total DRP1 expression level in the mitochondrial subfraction. Quantification of total DRP1 (C) and DRP1 phosphorylated at Ser637 (D) and Ser616 (E) in mitochondrial subfractions analyzed by western blotting in hearts from Sed rats that underwent (IR; n=7 hearts in duplicate) or not (n=4 hearts in duplicate) IR. DRP1 level was expressed relative to VDAC1 in mitochondria samples ( $^{\text{£}}p < 0.05$  Baseline vs IR, parametric *t* test; Data are the mean  $\pm$  SEM.).



**Figure 3. Effect of exercise training (ExTr) on mitochondrial dynamics during ischemia-reperfusion (IR).** (A) Schematic illustration of the IR experimental protocol. Hearts from Sedentary (Sed, n=5) and Exercised (ExTr, n=5) rats were stabilized for 30 min using a Langendorff apparatus. Then, hearts underwent global ischemia for 25 min followed by 10 min of reperfusion. Western blot and transmission electron microscopy were performed in heart tissue after 10 min of reperfusion. (B-E) Impact of exercise training on the DRP1-dependent mitochondrial fission pathway following IR. Western blotting of Sed (n=5 hearts in duplicate) and ExTr (n=6 hearts in duplicate) hearts that underwent global no-flow ischemia (25 min) followed by 10 min of reperfusion. (B) Representative western blots of phosphorylated DRP1 (p-DRP1<sup>Ser616</sup> and p-DRP1<sup>Ser637</sup>) and total DRP1 (DRP1). (C) Level of DRP1, (D) DRP1 phosphorylated at Ser616 (E) Ser637 in mitochondria subfractions analyzed by western blotting in Sed (n=5 hearts in duplicate) and ExTr (n=6 hearts in duplicate) hearts subjected to *ex vivo* IR. DRP1 levels were expressed relative to VDAC1 in mitochondria samples (\*p <0.05 ExTr vs Sed, parametric *t* test; Data are the mean ± SEM). (F-G) MFN2 expression in the mitochondrial subfraction following IR. (F) Representative western blots of MFN2. (G) Level of MFN2 expressed relative to VDAC1 in Sed (n=5 hearts in duplicate) and ExTr (n=6 hearts in duplicate) hearts subjected to *ex vivo* IR (\*p <0.05 ExTr vs Sed, parametric *t* test; Data are the mean ± SEM). (H) Representative transmission electron microscopy images of cardiac mitochondria from Sed and ExTr hearts that underwent or not IR (White arrows: elongated mitochondria). Quantification of the mitochondrial area (I), cristae density (J) and aspect ratio (K) of hearts from Baseline (no IR) or Sed and ExTr rats after IR. Mitochondrial shape was measured in approximately 450-600 mitochondria from 3 independent hearts in each condition (\*p <0.05 Sed vs ExTr, non-parametric Mann Whitney test; Data are median and interquartile range).

## Supplemental Materials

### 1. Animal model and exercise protocol

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive 2010/63/EU and approved by the local ethics committee (N° CEEA-00223, DAP27001). Male Wistar rats (12-week-old; weight=225–275 g, Janvier, France) were randomly assigned to sedentary control group (Sed), or 5-weeks exercise trained group (ExTr). Moderate exercise training was performed according to a protocol previously described to reduce heart vulnerability to IR [1]. Briefly, rats exercised on a motor-driven treadmill (Ugo Basile, Transforming ideas into instruments, 47300) 45 min/day, 5 days/week for 5 weeks at 25 m/min ( $\approx$  60% of their MAV). To avoid the acute effects of exercise, rats were sacrificed 24 h after the last exercise training session.

### 2. Ischemia-reperfusion (IR) on isolated perfused heart

Ischemia-reperfusion procedure was performed on a Langendorff apparatus as previously described [1]. Briefly, after stabilization, a global ischemia was performed for 25 min, followed by 10 min of reperfusion. The left ventricular (LV) pressure (MP36R, BioPac System Inc) was recorded during the entire perfusion and the cardiac functional recovery following IR was determined. Hearts tissues were collected and flash-frozen in liquid nitrogen for biochemical experiments, histological fluorescence staining or fixed in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in a sodium cacodylate buffer (0.1M) for electron microscopy analysis.

### 6. Western blotting

Immunoblotting was performed using standard techniques as previously described [4]. Briefly, mitochondrial subfraction from heart homogenates was isolated by differential centrifugation. Mitochondrial proteins were separated on polyacrylamide-SDS gels and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked and then incubated at 4°C with primary antibodies against Drp1 (1:1000, Cell Signaling), P-Drp1 S616 (1:500, Cell Signaling), P-Drp1 S637 (1:1000, Cell Signaling), Mfn2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) and VDAC1 (1:30 000, Cell Signaling). The corresponding HRP-conjugated IgG (secondary antibodies) were used according to standard procedures. Immunodetection and revelation were carried out using the ECL chemiluminescence system (VILBER Fusion FX).

### 7. Transmission electron microscopy

After ex-vivo IR, left ventricular samples from perfused hearts were washed and fixed in 2.5% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde in a sodium cacodylate buffer (0.1M) during 2 hours at RT and next at 4°C overnight. After rinsing, samples were post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1h, dehydrated through a graded series of ethanol and embedded in resin. Ultrathin sections of heart tissues were prepared with a diamond knife on a Reichert Ultracut E ultramicrotome and stained with uranyl acetate and lead citrate. Images were photographed under a transmission electron microscope (TEM Hitachi H7800) by randomly selecting photos of longitudinally-arranged cardiomyocytes. Mitochondrial area and perimeter were quantified by manual contouring using ImageJ software, excluding swelled mitochondria. More than 600 mitochondria were analysed to determine mitochondria sizes parameters and the aspect ratio which reflects the “length to width ratio” was calculated.

## 8. Statistical analyses

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Experimental conditions were compared with Student's t test, analysis of variance (ANOVA) when data were normally distributed (confirmed with the Shapiro–Wilk normality test). When necessary, non-parametric tests were used (Mann–Whitney test for two groups). A value of  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. Statistical analyses were done with the GraphPad Prism software (8.4.3).

## Bibliography

- [1] C. Farah et al., « Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites », *Basic Res Cardiol*, vol. 108, no 6, p. 389, oct. 2013, doi: 10.1007/s00395-013-0389-2.
- [2] D. Boulghobra et al., « Sinapine, but not sinapic acid, counteracts mitochondrial oxidative stress in cardiomyocytes », *Redox Biology*, vol. 34, p. 101554, juill. 2020, doi: 10.1016/j.redox.2020.101554.
- [3] D. Boulghobra et al., « Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: a key mechanism of exercise-induced cardioprotection », *Basic Res Cardiol*, vol. 116, no 1, p. 66, déc. 2021, doi: 10.1007/s00395-021-00906-3.
- [4] 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.





# BIBLIOGRAPHIE

## **Bibliographie**

- Abe, K., Hayashi, N., & Terada, H. (1999). Effect of endogenous nitric oxide on energy metabolism of rat heart mitochondria during ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3–4), 379–387. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00222-6)
- Abuarab, N., Munsey, T. S., Jiang, L.-H., Li, J., & Sivaprasadarao, A. (2017). High glucose–induced ROS activates TRPM2 to trigger lysosomal membrane permeabilization and Zn<sup>2+</sup>-mediated mitochondrial fission. *Science Signaling*, 10(490), eaal4161. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4161>
- Adachi, Y., Kato, T., Yamada, T., Murata, D., Arai, K., Stahelin, R. V., Chan, D. C., Iijima, M., & Sesaki, H. (2020). Drp1 Tubulates the ER in a GTPase-Independent Manner. *Molecular Cell*, 80(4), 621-632.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.013>
- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (2005). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin–Dependent Protein Kinase Modulates Cardiac Ryanodine Receptor Phosphorylation and Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak in Heart Failure. *Circulation Research*, 97(12), 1314–1322. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000194329.41863.89>
- Aishwarya, R., Alam, S., Abdullah, C. S., Morshed, M., Nitu, S. S., Panchatcharam, M., Miriyala, S., Kevil, C. G., & Bhuiyan, Md. S. (2020). Pleiotropic effects of mdivi-1 in altering mitochondrial dynamics, respiration, and autophagy in cardiomyocytes. *Redox Biology*, 36, 101660. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101660>
- Alavian, K. N., Beutner, G., Lazrove, E., Sacchetti, S., Park, H.-A., Licznarski, P., Li, H., Nabili, P., Hockensmith, K., Graham, M., Porter, G. A., & Jonas, E. A. (2014). An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), 10580–10585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401591111>
- Alserius, T., Hammar, N., Nordqvist, T., & Ivert, T. (2006). Risk of death or acute myocardial infarction 10 years after coronary artery bypass surgery in relation to type of diabetes. *American Heart Journal*, 152(3), 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2006.02.010>
- Amanakis, G., Sun, J., Fergusson, M. M., McGinty, S., Liu, C., Molkentin, J. D., & Murphy, E. (2021). Cysteine 202 of cyclophilin D is a site of multiple post-translational modifications and plays a role in cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 117(1), 212–223. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa053>
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(Supplement\_1), S81–S90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Anand, R., Wai, T., Baker, M. J., Kladt, N., Schauss, A. C., Rugarli, E., & Langer, T. (2014). The *i*-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *Journal of Cell Biology*, 204(6), 919–929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308006>
- Andrienko, T. N., Pasdois, P., Pereira, G. C., Ovens, M. J., & Halestrap, A. P. (2017). The role of succinate and ROS in reperfusion injury – A critical appraisal. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 110, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.06.016>
- Andrienko, T. N., Picht, E., & Bers, D. M. (2009). Mitochondrial free calcium regulation during sarcoplasmic reticulum calcium release in rat cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(6), 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.015>
- Aneja, A., Tang, W. H. W., Bansilal, S., Garcia, M. J., & Farkouh, M. E. (2008). Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. *The American Journal of Medicine*, 121(9), 748–757. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2008.03.046>

- Ashok, D., Papanicolaou, K., Sidor, A., Wang, M., Solhjoo, S., Liu, T., & O'Rourke, B. (2023). Mitochondrial membrane potential instability on reperfusion after ischemia does not depend on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 299(6), 104708. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104708>
- Baddeley, D., Jayasinghe, I., Lam, L., Rossberger, S., Cannell, M. B., & Soeller, C. (2009). Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22275–22280. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908971106>
- Baines, C. P., Kaiser, R. A., Purcell, N. H., Blair, N. S., Osinska, H., Hambleton, M. A., Brunskill, E. W., Sayen, M. R., Gottlieb, R. A., Dorn, G. W., Robbins, J., & Molkenstein, J. D. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*, 434(7033), 658–662. <https://doi.org/10.1038/nature03434>
- Balshaw, D. M., Xu, L., Yamaguchi, N., Pasek, D. A., & Meissner, G. (2001). Calmodulin Binding and Inhibition of Cardiac Muscle Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor). *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20144–20153. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010771200>
- Balteau, M., Tajeddine, N., de Meester, C., Ginion, A., Des Rosiers, C., Brady, N. R., Sommereyns, C., Horman, S., Vanoverschelde, J.-L., Gailly, P., Hue, L., Bertrand, L., & Beauloye, C. (2011). NADPH oxidase activation by hyperglycaemia in cardiomyocytes is independent of glucose metabolism but requires SGLT1. *Cardiovascular Research*, 92(2), 237–246. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr230>
- Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K., & Ishihara, N. (2017). Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nature Cell Biology*, 19(7), 856–863. <https://doi.org/10.1038/ncb3560>
- Ban, T., Kohno, H., Ishihara, T., & Ishihara, N. (2018). Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1859(9), 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.016>
- Barth, E., Stammler, G., Speiser, B., & Schaper, J. (1992). *In Cardiac Muscle From 10 Different Animal Species Including Man*.
- Battault, S., Renguet, E., Van Steenberghe, A., Horman, S., Beauloye, C., & Bertrand, L. (2020). Myocardial glucotoxicity: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 113(11), 736–748. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2020.06.006>
- Beavers, D. L., Landstrom, A. P., Chiang, D. Y., & Wehrens, X. H. T. (2014). Emerging roles of junctophilin-2 in the heart and implications for cardiac diseases. *Cardiovascular Research*, 103(2), 198–205. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu151>
- Becker, L. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, 61(3), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.025>
- Becker, L. B., vanden Hoek, T. L., Shao, Z.-H., Li, C.-Q., & Schumacker, P. T. (1999). Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(6), H2240–H2246. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.6.H2240>
- Beikoghli Kalkhoran, S., Hall, A. R., White, I. J., Cooper, J., Fan, Q., Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Cabrera-Fuentes, H., Chinda, K., Chakraborty, B., Dorn, G. W., Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2017). Assessing the effects of mitofusin 2 deficiency in the adult heart using 3D electron tomography. *Physiological Reports*, 5(17), e13437. <https://doi.org/10.14814/phy2.13437>
- Bell, C. J., Bright, N. A., Rutter, G. A., & Griffiths, E. J. (2006). ATP Regulation in Adult Rat Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28058–28067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604540200>

- Benhabbouche, S., Crola da Silva, C., Abrial, M., & Ferrera, R. (2011). Base des phénomènes d'ischémie reperfusion et de la protection myocardique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, *30*, S2–S16. [https://doi.org/10.1016/S0750-7658\(11\)70002-8](https://doi.org/10.1016/S0750-7658(11)70002-8)
- Bernardi, P., Carraro, M., & Lippe, G. (2022). The mitochondrial permeability transition: Recent progress and open questions. *The FEBS Journal*, *289*(22), 7051–7074. <https://doi.org/10.1111/febs.16254>
- Bernardi, P., & Di Lisa, F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *78*, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.023>
- Bernardi, P., Gerle, C., Halestrap, A. P., Jonas, E. A., Karch, J., Mnatsakanyan, N., Pavlov, E., Sheu, S.-S., & Soukas, A. A. (2023). Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: Controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death & Differentiation*, *30*(8), 1869–1885. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>
- Bernardi, P., & von Stockum, S. (2012). The permeability transition pore as a Ca<sup>2+</sup> release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*, *52*(1), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.03.004>
- Bers, D. (2004). Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *37*(2), 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.026>
- Bers, D. M. (2002). *Cardiac excitation–contraction coupling*. 415.
- Bers, D. M., & Shannon, T. R. (2013). Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *58*, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.01.002>
- Bertero, E., & Maack, C. (2018). Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circulation Research*, *122*(10), 1460–1478. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.310082>
- Bertoluci, M. C., & Rocha, V. Z. (2017). Cardiovascular risk assessment in patients with diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, *9*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0225-1>
- Beutner, G., Sharma, V. K., Giovannucci, D. R., Yule, D. I., & Sheu, S.-S. (2001). Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(24), 21482–21488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101486200>
- Beutner, G., Sharma, V. K., Lin, L., Ryu, S.-Y., Dirksen, R. T., & Sheu, S.-S. (2005). Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: Transducer of excitation–metabolism coupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1717*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.016>
- Bezprozvanny, L., Watras, J., & Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, *351*(6329), 751–754. <https://doi.org/10.1038/351751a0>
- Bleck, C. K. E., Kim, Y., Willingham, T. B., & Glancy, B. (2018). Subcellular connectomic analyses of energy networks in striated muscle. *Nature Communications*, *9*(1), 5111. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07676-y>
- Boncompagni, S., Rossi, A. E., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Polishchuk, R. S., Dirksen, R. T., & Protasi, F. (2009). Mitochondria Are Linked to Calcium Stores in Striated Muscle by Developmentally Regulated Tethering Structures. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(3), 1058–1067. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0783>
- Bootman, M. D., Higazi, D. R., Coombes, S., & Roderick, H. L. (2006). Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *Journal of Cell Science*, *119*(19), 3915–3925. <https://doi.org/10.1242/jcs.03223>

- Bordt, E. A., Clerc, P., Roelofs, B. A., Saladino, A. J., Tretter, L., Adam-Vizi, V., Cherok, E., Khalil, A., Yadava, N., Ge, S. X., Francis, T. C., Kennedy, N. W., Picton, L. K., Kumar, T., Uppuluri, S., Miller, A. M., Itoh, K., Karbowski, M., Sesaki, H., ... Polster, B. M. (2017). The Putative Drp1 Inhibitor mdivi-1 Is a Reversible Mitochondrial Complex I Inhibitor that Modulates Reactive Oxygen Species. *Developmental Cell*, 40(6), 583-594.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.020>
- Bordt, E. A., Zhang, N., Waddell, J., & Polster, B. M. (2022). The Non-Specific Drp1 Inhibitor Mdivi-1 Has Modest Biochemical Antioxidant Activity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(3), 450. <https://doi.org/10.3390/antiox11030450>
- Borutaite, V., & Brown, G. C. (2006). S-nitrosothiol inhibition of mitochondrial complex I causes a reversible increase in mitochondrial hydrogen peroxide production. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1757(5–6), 562–566. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.02.014>
- Boudina, S., Sena, S., Theobald, H., Sheng, X., Wright, J. J., Hu, X. X., Aziz, S., Johnson, J. I., Bugger, H., Zaha, V. G., & Abel, E. D. (2007). Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes. *Diabetes*, 56(10), 2457–2466. <https://doi.org/10.2337/db07-0481>
- Boulghobra, D., Dubois, M., Alpha-Bazin, B., Coste, F., Olmos, M., Gayraud, S., Bornard, I., Meyer, G., Gaillard, J.-C., Armengaud, J., & Reboul, C. (2021). Increased protein S-nitrosylation in mitochondria: A key mechanism of exercise-induced cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 116(1), 66. <https://doi.org/10.1007/s00395-021-00906-3>
- Bovo, E., Lipsius, S. L., & Zima, A. V. (2012). Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves during  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes: Ca<sup>2+</sup> waves during  $\beta$ -adrenergic stimulation. *The Journal of Physiology*, 590(14), 3291–3304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230748>
- Bovo, E., Mazurek, S. R., & Zima, A. V. (2018). Oxidation of ryanodine receptor after ischemia-reperfusion increases propensity of Ca<sup>2+</sup> waves during  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 315(4), H1032–H1040. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00334.2018>
- Braunersreuther, V., Montecucco, F., Ashri, M., Pelli, G., Galan, K., Frias, M., Burger, F., Quinderé, A. L. G., Montessuit, C., Krause, K.-H., Mach, F., & Jaquet, V. (2013). Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 64, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.007>
- Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1982). The stunned myocardium: Prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66(6), 1146–1149. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.66.6.1146>
- Breitzig, M. T., Alleyn, M. D., Lockey, R. F., & Kolliputi, N. (2018). A mitochondrial delicacy: Dynamin-related protein 1 and mitochondrial dynamics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 315(1), C80–C90. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00042.2018>
- Brennan, J., Southworth, R., Medina, R., Davidson, S., Duchon, M., & Shattock, M. (2006). Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation. *Cardiovascular Research*, 72(2), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.019>
- Brillantes, A.-M. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinisky, E., Ondriašová, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., & Marks, A. R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*, 77(4), 513–523. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90214-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90214-3)
- Brochet, D. X. P., Yang, D., Maio, A. D., Lederer, W. J., Franzini-Armstrong, C., & Cheng, H. (2005). Ca<sup>2+</sup> blinks: Rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3099–3104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500059102>

- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *287*(4), C817–C833. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- Bround, M. J., Bers, D. M., & Molkenkin, J. D. (2020). A 20/20 view of ANT function in mitochondrial biology and necrotic cell death. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *144*, A3–A13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.012>
- Brustovetsky, N., & Klingenberg, M. (1996). Mitochondrial ADP/ATP Carrier Can Be Reversibly Converted into a Large Channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry*, *35*(26), 8483–8488. <https://doi.org/10.1021/bi960833v>
- Bugger, H., & Abel, E. D. (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, *57*(4), 660–671. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3171-6>
- Bugger, H., & Pfeil, K. (2020). Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1866*(7), 165768. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165768>
- Buntinas, L., Gunter, K. K., Sparagna, G. C., & Gunter, T. E. (2001). The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): Comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1504*(2–3), 248–261. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00254-1)
- Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M., Tompkins, A. J., Young, S., & Brookes, P. S. (2006). Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochemical Journal*, *394*(Pt 3), 627–634. <https://doi.org/10.1042/BJ20051435>
- Calvert, J. W., Condit, M. E., Aragón, J. P., Nicholson, C. K., Moody, B. F., Hood, R. L., Sindler, A. L., Gundewar, S., Seals, D. R., Barouch, L. A., & Lefer, D. J. (2011). Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of β(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: Role of nitrite and nitrosothiols. *Circulation Research*, *108*(12), 1448–1458. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241117>
- Carraro, M., Giorgio, V., Šileikytė, J., Sartori, G., Forte, M., Lippe, G., Zoratti, M., Szabò, I., & Bernardi, P. (2014). Channel Formation by Yeast F-ATP Synthase and the Role of Dimerization in the Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(23), 15980–15985. <https://doi.org/10.1074/jbc.C114.559633>
- Carrer, A., Tommasin, L., Šileikytė, J., Ciscato, F., Filadi, R., Urbani, A., Forte, M., Rasola, A., Szabò, I., Carraro, M., & Bernardi, P. (2021). Defining the molecular mechanisms of the mitochondrial permeability transition through genetic manipulation of F-ATP synthase. *Nature Communications*, *12*(1), 4835. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25161-x>
- Carroll, J., He, J., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2019). Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(26), 12816–12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904005116>
- Cassidy-Stone, A., Chipuk, J. E., Ingeman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M. J., Shaw, J. T., Hinshaw, J. E., Green, D. R., & Nunnari, J. (2008). Chemical Inhibition of the Mitochondrial Division Dynamin Reveals Its Role in Bax/Bak-Dependent Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization. *Developmental Cell*, *14*(2), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.11.019>
- Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., de Brito, O. M., Chang, C. R., Blackstone, C., Bernardi, P., & Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(41), 15803–15808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808249105>
- Chakrabarti, R., Ji, W.-K., Stan, R. V., de Juan Sanz, J., Ryan, T. A., & Higgs, H. N. (2018). INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *Journal of Cell Biology*, *217*(1), 251–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709111>



- Chalmers, S., & Nicholls, D. G. (2003). The Relationship between Free and Total Calcium Concentrations in the Matrix of Liver and Brain Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19062–19070. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212661200>
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., & Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11715–11720. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715>
- Chang, C.-R., & Blackstone, C. (2007). Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation of Drp1 Regulates Its GTPase Activity and Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21583–21587. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700083200>
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2006). Reversible Blockade of Electron Transport during Ischemia Protects Mitochondria and Decreases Myocardial Injury following Reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 319(3), 1405–1412. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.110262>
- Chen, W., Wang, R., Chen, B., Zhong, X., Kong, H., Bai, Y., Zhou, Q., Xie, C., Zhang, J., Guo, A., Tian, X., Jones, P. P., O'Mara, M. L., Liu, Y., Mi, T., Zhang, L., Bolstad, J., Semeniuk, L., Cheng, H., ... Chen, S. R. W. (2014). The ryanodine receptor store-sensing gate controls Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup>-triggered arrhythmias. *Nature Medicine*, 20(2), 184–192. <https://doi.org/10.1038/nm.3440>
- Chen, Y., Csordás, G., Jowdy, C., Schneider, T. G., Csordás, N., Wang, W., Liu, Y., Kohlhaas, M., Meiser, M., Bergem, S., Nerbonne, J. M., Dorn, G. W., & Maack, C. (2012). Mitofusin 2-Containing Mitochondrial-Reticular Microdomains Direct Rapid Cardiomyocyte Bioenergetic Responses Via Interorganelle Ca<sup>2+</sup> Crosstalk. *Circulation Research*, 111(7), 863–875. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.266585>
- Chen, Y., Liu, Y., & Dorn, G. W. (2011). Mitochondrial Fusion is Essential for Organelle Function and Cardiac Homeostasis. *Circulation Research*, 109(12), 1327–1331. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258723>
- Cheng, H., & Lederer, W. J. (2008). Calcium Sparks. *Physiological Reviews*, 88(4), 1491–1545. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2007>
- Cho, B., Cho, H. M., Jo, Y., Kim, H. D., Song, M., Moon, C., Kim, H., Kim, K., Sesaki, H., Rhyu, I. J., Kim, H., & Sun, W. (2017). Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nature Communications*, 8(1), 15754. <https://doi.org/10.1038/ncomms15754>
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Logan, A., Nadtochiy, S. M., Ord, E. N. J., Smith, A. C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A. J., James, A. M., Rogatti, S., Hartley, R. C., Eaton, S., Costa, A. S. H., ... Murphy, M. P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515(7527), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature13909>
- Chouchani, E. T., Pell, V. R., James, A. M., Work, L. M., Saeb-Parsy, K., Frezza, C., Krieg, T., & Murphy, M. P. (2016). A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metabolism*, 23(2), 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009>
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B., & Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), 15927–15932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>
- Clark, R. J., McDonough, P. M., Swanson, E., Trost, S. U., Suzuki, M., Fukuda, M., & Dillmann, W. H. (2003). Diabetes and the Accompanying Hyperglycemia Impairs Cardiomyocyte Calcium Cycling through Increased Nuclear O-GlcNAcylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44230–44237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303810200>
- Coronado, M., Fajardo, G., Nguyen, K., Zhao, M., Kooiker, K., Jung, G., Hu, D.-Q., Reddy, S., Sandoval, E., Stotland, A., Gottlieb, R. A., & Bernstein, D. (2018). Physiologic Mitochondrial Fragmentation Is a Normal Cardiac

Adaptation to Increased Energy Demand. *Circulation Research*, 122(2), 282–295. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310725>

Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8(10), 939–944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>

Crompton, M., Ellinger, H., & 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. *Biochemical Journal*, 255(1), 357–360.

Crompton, M., Virji, S., & Ward, J. M. (1998). Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *European Journal of Biochemistry*, 258(2), 729–735. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580729.x>

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., Kotliansky, V., Adijanto, J., Mootha, V. K., & Hajnóczky, G. (2013). MICU1 Controls Both the Threshold and Cooperative Activation of the Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter. *Cell Metabolism*, 17(6), 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.020>

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A., & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, 174(7), 915–921. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604016>

Cung, T.-T., Morel, O., Cayla, G., Rioufol, G., Garcia-Dorado, D., Angoulvant, D., Bonnefoy-Cudraz, E., Guérin, P., Elbaz, M., Delarche, N., Coste, P., Vanzetto, G., Metge, M., Aupetit, J.-F., Jouve, B., Motreff, P., Tron, C., Labeque, J.-N., Steg, P. G., ... Ovize, M. (2015). Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 373(11), 1021–1031. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505489>

Dabkowski, E. R., Williamson, C. L., Bukowski, V. C., Chapman, R. S., Leonard, S. S., Peer, C. J., Callery, P. S., & Hollander, J. M. (2009). Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(2), H359–H369. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00467.2008>

Davidson, S. M., & Duchen, M. R. (2006). Calcium microdomains and oxidative stress. *Cell Calcium*, 40(5–6), 561–574. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.017>

de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605–610. <https://doi.org/10.1038/nature07534>

De La Fuente, S., Fernandez-Sanz, C., Vail, C., Agra, E. J., Holmstrom, K., Sun, J., Mishra, J., Williams, D., Finkel, T., Murphy, E., Joseph, S. K., Sheu, S.-S., & Csordás, G. (2016). Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 291(44), 23343–23362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755496>

De La Fuente, S., Lambert, J. P., Nichtova, Z., Fernandez Sanz, C., Elrod, J. W., Sheu, S.-S., & Csordás, G. (2018). Spatial Separation of Mitochondrial Calcium Uptake and Extrusion for Energy-Efficient Mitochondrial Calcium Signaling in the Heart. *Cell Reports*, 24(12), 3099–3107.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.040>

de la Fuente, S., Matesanz-Isabel, J., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Alvarez, J. (2014). Dynamics of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in MICU1-knockdown cells. *Biochemical Journal*, 458(1), 33–40. <https://doi.org/10.1042/BJ20131025>

De la Fuente, S., & Sheu, S.-S. (2019). SR-mitochondria communication in adult cardiomyocytes: A close relationship where the Ca<sup>2+</sup> has a lot to say. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 663, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.026>

- De Luca, G., Suryapranata, H., Ottervanger, J. P., & Antman, E. M. (2004). Time Delay to Treatment and Mortality in Primary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction: Every Minute of Delay Counts. *Circulation*, *109*(10), 1223–1225. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121424.76486.20>
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, *476*(7360), 336–340. <https://doi.org/10.1038/nature10230>
- Dedkova, E., & Blatter, L. (2008). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and the heart. *Cell Calcium*, *44*(1), 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.002>
- Deedwania, P., Kosiborod, M., Barrett, E., Ceriello, A., Isley, W., Mazzone, T., & Raskin, P. (2008). Hyperglycemia and Acute Coronary Syndrome: A Scientific Statement From the American Heart Association Diabetes Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, *117*(12), 1610–1619. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.188629>
- Depre, C., Vanoverschelde, J.-L. J., & Taegtmeyer, H. (1999). *Glucose for the Heart*.
- des Georges, A., Clarke, O. B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K. J., Grassucci, R. A., Hendrickson, W. A., Marks, A. R., & Frank, J. (2016). Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. *Cell*, *167*(1), 145–157.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.075>
- Di Carlo, M. N., Said, M., Ling, H., Valverde, C. A., De Giusti, V. C., Sommesse, L., Palomeque, J., Aiello, E. A., Skapura, D. G., Rinaldi, G., Respress, J. L., Brown, J. H., Wehrens, X. H. T., Salas, M. A., & Mattiazzi, A. (2014). CaMKII-dependent phosphorylation of cardiac ryanodine receptors regulates cell death in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *74*, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.06.004>
- Dia, M., Gomez, L., Thibault, H., Tessier, N., Leon, C., Chouabe, C., Ducreux, S., Gallo-Bona, N., Tubbs, E., Bendridi, N., Chanon, S., Leray, A., Belmudes, L., Couté, Y., Kurdi, M., Ovize, M., Rieusset, J., & Paillard, M. (2020). Reduced reticulum–mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology*, *115*(6), 74. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-00835-7>
- Diaz-Juarez, J., Suarez, J., Cividini, F., Scott, B. T., Diemer, T., Dai, A., & Dillmann, W. H. (2016). Expression of the mitochondrial calcium uniporter in cardiac myocytes improves impaired mitochondrial calcium handling and metabolism in simulated hyperglycemia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *311*(6), C1005–C1013. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00236.2016>
- Ding, M., Dong, Q., Liu, Z., Liu, Z., Qu, Y., Li, X., Huo, C., Jia, X., Fu, F., & Wang, X. (2017). Inhibition of dynamin-related protein 1 protects against myocardial ischemia–reperfusion injury in diabetic mice. *Cardiovascular Diabetology*, *16*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0501-2>
- Disatnik, M., Ferreira, J. C. B., Campos, J. C., Gomes, K. S., Dourado, P. M. M., Qi, X., & Mochly-Rosen, D. (2013). Acute Inhibition of Excessive Mitochondrial Fission After Myocardial Infarction Prevents Long-term Cardiac Dysfunction. *Journal of the American Heart Association*, *2*(5), e000461. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000461>
- Dobrev, D., & Wehrens, X. H. T. (2014). Role of RyR2 Phosphorylation in Heart Failure and Arrhythmias: Controversies Around Ryanodine Receptor Phosphorylation in Cardiac Disease. *Circulation Research*, *114*(8), 1311–1319. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300568>
- Donahoe, S. M., Stewart, G. C., McCabe, C. H., Mohanavelu, S., Murphy, S. A., Cannon, C. P., & Antman, E. M. (2007). Diabetes and Mortality Following Acute Coronary Syndromes. *JAMA*, *298*(7), 765. <https://doi.org/10.1001/jama.298.7.765>
- Dong, Z., Shanmughapriya, S., Tomar, D., Siddiqui, N., Lynch, S., Nemani, N., Breves, S. L., Zhang, X., Tripathi, A., Palaniappan, P., Riitano, M. F., Worth, A. M., Seelam, A., Carvalho, E., Subbiah, R., Jaña, F., Soboloff, J., Peng, Y.,

- Cheung, J. Y., ... Madesh, M. (2017). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Molecular Cell*, 65(6), 1014–1028.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.032>
- Dorn, G. W., & Kitsis, R. N. (2015). The Mitochondrial Dynamism-Mitophagy-Cell Death Interactome: Multiple Roles Performed by Members of a Mitochondrial Molecular Ensemble. *Circulation Research*, 116(1), 167–182. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303554>
- Dorn, G. W., Song, M., & Walsh, K. (2015). Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.015>
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M. F., Attardi, G., Larsson, N.-G., Neupert, W., & Reichert, A. S. (2006). Proteolytic Processing of OPA1 Links Mitochondrial Dysfunction to Alterations in Mitochondrial Morphology. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37972–37979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606059200>
- Eisner, V., Csordás, G., & 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. *Journal of Cell Science*, jcs.093609. <https://doi.org/10.1242/jcs.093609>
- Eisner, V., Cupo, R. R., Gao, E., Csordás, G., Slovinsky, W. S., Paillard, M., Cheng, L., Ibeti, J., Chen, S. R. W., Chuprun, J. K., Hoek, J. B., Koch, W. J., & Hajnóczky, G. (2017). Mitochondrial fusion dynamics is robust in the heart and depends on calcium oscillations and contractile activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1617288114>
- Eitel, I., Hintze, S., Waha, S. de, Fuernau, G., Lurz, P., Desch, S., Schuler, G., & Thiele, H. (2012). Prognostic Impact of Hyperglycemia in Nondiabetic and Diabetic Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: Insights From Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 5(6), 708–718. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.112.974998>
- El-Hattab, A. W., Suleiman, J., Almannai, M., & Scaglia, F. (2018). Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Molecular Genetics and Metabolism*, 125(4), 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.003>
- Erickson, J. R., Joiner, M. A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Bartlett, R. K., Lowe, J. S., O'Donnell, S. E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M. C., Zimmerman, K., Ham, A.-J. L., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Shea, M. A., Colbran, R. J., Mohler, P. J., & Anderson, M. E. (2008). A Dynamic Pathway for Calcium-Independent Activation of CaMKII by Methionine Oxidation. *Cell*, 133(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.048>
- Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M., & Bers, D. M. (2013). Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature*, 502(7471), 372–376. <https://doi.org/10.1038/nature12537>
- Fan, M., Zhang, J., Tsai, C.-W., Orlando, B. J., Rodriguez, M., Xu, Y., Liao, M., Tsai, M.-F., & Feng, L. (2020). Structure and mechanism of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter holocomplex. *Nature*, 582(7810), 129–133. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2309-6>
- Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayraud, S., Geny, B., Obert, P., Cazorla, O., Tanguy, S., & Reboul, C. (2013). Exercise-induced cardioprotection: A role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Research in Cardiology*, 108(6), 389. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0389-2>
- Fauconnier, J., Meli, A. C., Thireau, J., Roberge, S., Shan, J., Sassi, Y., Reiken, S. R., Rauzier, J.-M., Marchand, A., Chauvier, D., Cassan, C., Crozier, C., Bideaux, P., Lompré, A.-M., Jacotot, E., Marks, A. R., & Lacampagne, A. (2011). Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(32), 13258–13263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100286108>

- Fauconnier, J., Roberge, S., Saint, N., & Lacampagne, A. (2013). Type 2 ryanodine receptor: A novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics*, *138*(3), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.015>
- Fearnley, C. J., Roderick, H. L., & Bootman, M. D. (2011). Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(11), a004242–a004242. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004242>
- Feno, S., Butera, G., Vecellio Reane, D., Rizzuto, R., & Raffaello, A. (2019). Crosstalk between Calcium and ROS in Pathophysiological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2019/9324018>
- Fernandez-Sanz, C., De La Fuente, S., Nichtova, Z., Yuan, Y., Lanvermann, S., Tsai, H.-Y., Ferderico, M., Xin, Y., Csordas, G., Wang, W., Mourier, A., & Sheu, S.-S. (2021). *ACTIN Anchors the Highly Oligomeric DRP1 at Mitochondria-Sarcoplasmic Reticulum Contact Sites in Adult Murine Heart: Its Functional Implication* [Preprint]. *Physiology*. <https://doi.org/10.1101/2021.11.29.470468>
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., Alfieri, O., & Visioli, O. (1993). Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *European Heart Journal*, *14*(suppl G), 25–30. [https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.suppl\\_G.25](https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.suppl_G.25)
- Fieni, F., Bae Lee, S., Jan, Y. N., & Kirichok, Y. (2012). Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. *Nature Communications*, *3*(1), 1317. <https://doi.org/10.1038/ncomms2325>
- Fieni, F., Johnson, D. E., Hudmon, A., & Kirichok, Y. (2014). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter and CaMKII in heart. *Nature*, *513*(7519), E1–E2. <https://doi.org/10.1038/nature13626>
- Fliss, H., & Gattinger, D. (1996). Apoptosis in Ischemic and Reperfused Rat Myocardium. *Circulation Research*, *79*(5), 949–956. <https://doi.org/10.1161/01.RES.79.5.949>
- Fournier, N., Ducet, G., & Crevat, A. (1987). Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *19*(3), 297–303. <https://doi.org/10.1007/BF00762419>
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L., & Youle, R. J. (2001). The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Developmental Cell*, *1*(4), 515–525. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7)
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., & Ramesh, V. (1999). Shape, Size, and Distribution of Ca<sup>2+</sup> Release Units and Couplons in Skeletal and Cardiac Muscles. *Biophysical Journal*, *77*(3), 1528–1539. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77000-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77000-1)
- Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J., & Voeltz, G. K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*, *334*(6054), 358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>
- Galkin, A., Abramov, A. Y., Frakich, N., Duchon, M. R., & Moncada, S. (2009). Lack of Oxygen Deactivates Mitochondrial Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(52), 36055–36061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054346>
- Gao, P., Yan, Z., & Zhu, Z. (2020). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 604240. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.604240>
- Garbincius, J. F., & Elrod, J. W. (2022). Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. *Physiological Reviews*, *102*(2), 893–992. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2020>
- Garcia-Dorado, D., Théroux, P., Duran, J. M., Solares, J., Alonso, J., Sanz, E., Munoz, R., Elizaga, J., Botas, J., & Fernandez-Avilés, F. (1992). Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*, *85*(3), 1160–1174. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.3.1160>

- García-Pérez, C., Hajnóczky, G., & Csordás, G. (2008). Physical Coupling Supports the Local Ca<sup>2+</sup> Transfer between Sarcoplasmic Reticulum Subdomains and the Mitochondria in Heart Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32771–32780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803385200>
- Gawlowski, T., Suarez, J., Scott, B., Torres-Gonzalez, M., Wang, H., Schwappacher, R., Han, X., Yates, J. R., Hoshijima, M., & Dillmann, W. (2012). Modulation of Dynamin-related Protein 1 (DRP1) Function by Increased O-linked-β-N-acetylglucosamine Modification (O-GlcNAc) in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 30024–30034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390682>
- Ge, Y., Shi, X., Boopathy, S., McDonald, J., Smith, A. W., & Chao, L. H. (2020). Two forms of Opa1 cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane. *ELife*, 9, e50973. <https://doi.org/10.7554/eLife.50973>
- Ghahremani, R., Damirchi, A., Salehi, I., Komaki, A., & Esposito, F. (2018). Mitochondrial dynamics as an underlying mechanism involved in aerobic exercise training-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences*, 213, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.035>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 204–224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Ginsburg, K. S., & Bers, D. M. (2004). Modulation of excitation-contraction coupling by isoproterenol in cardiomyocytes with controlled SR Ca<sup>2+</sup> load and Ca<sup>2+</sup> current trigger: Adrenergic modulation of excitation-contraction coupling. *The Journal of Physiology*, 556(2), 463–480. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055384>
- Giorgi, C., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., Suski, J. M., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion*, 12(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.07.004>
- Giorgi, C., Marchi, S., & Pinton, P. (2018). The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(11), 713–730. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G. D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabó, I., Lippe, G., & Bernardi, P. (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5887–5892. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>
- Glancy, B., & Balaban, R. S. (2012). Role of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry*, 51(14), 2959–2973. <https://doi.org/10.1021/bi2018909>
- Glancy, B., Willis, W. T., Chess, D. J., & Balaban, R. S. (2013). Effect of Calcium on the Oxidative Phosphorylation Cascade in Skeletal Muscle Mitochondria. *Biochemistry*, 52(16), 2793–2809. <https://doi.org/10.1021/bi3015983>
- Glatz, J. F. C., Nabben, M., Young, M. E., Schulze, P. C., Taegtmeier, H., & Luiken, J. J. F. P. (2020). Re-balancing cellular energy substrate metabolism to mend the failing heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165579. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165579>
- Gomez, L., Thiebaut, P.-A., Paillard, M., Ducreux, S., Abrial, M., Crola Da Silva, C., Durand, A., Alam, M. R., Van Coppenolle, F., Sheu, S.-S., & Ovize, M. (2016). The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3β during reperfusion injury. *Cell Death & Differentiation*, 23(2), 313–322. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.101>
- Gong, G., Liu, X., Zhang, H., Sheu, S.-S., & Wang, W. (2015). Mitochondrial flash as a novel biomarker of mitochondrial respiration in the heart. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 309(7), H1166–H1177. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00462.2015>

- Gorenkova, N., Robinson, E., Grieve, D. J., & Galkin, A. (2013). Conformational Change of Mitochondrial Complex I Increases ROS Sensitivity During Ischemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, *19*(13), 1459–1468. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4698>
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, *6*, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, *6*, 524–551. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>
- Greenstein, J. L., & Winslow, R. L. (2011). Integrative Systems Models of Cardiac Excitation–Contraction Coupling. *Circulation Research*, *108*(1), 70–84. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223578>
- Griffin, E. E., & Chan, D. C. (2006). Domain Interactions within Fzo1 Oligomers Are Essential for Mitochondrial Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16599–16606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601847200>
- Griffiths, E. J. (1999). Reversal of mitochondrial Na/Ca exchange during metabolic inhibition in rat cardiomyocytes. *FEBS Letters*, *453*(3), 400–404. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00726-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00726-7)
- Griffiths, E. J., Balaska, D., & Cheng, W. H. Y. (2010). The ups and downs of mitochondrial calcium signalling in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(6–7), 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.022>
- Guan, L., Che, Z., Meng, X., Yu, Y., Li, M., Yu, Z., Shi, H., Yang, D., & Yu, M. (2019). MCU Up-regulation contributes to myocardial ischemia-reperfusion Injury through calpain/OPA-1-mediated mitochondrial fusion/mitophagy Inhibition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(11), 7830–7843. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14662>
- Gutiérrez-Aguilar, M., Douglas, D. L., Gibson, A. K., Domeier, T. L., Molkentin, J. D., & Baines, C. P. (2014). Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *72*, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>
- Györke, I., Hester, N., Jones, L. R., & Györke, S. (2004). The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophysical Journal*, *86*(4), 2121–2128. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74271-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74271-X)
- Halestrap, A. (2005). Biochemistry: A pore way to die. *Nature*, *434*(7033), 578–579. <https://doi.org/10.1038/434578a>
- Halestrap, A. P. (2010). A pore way to die: The role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochemical Society Transactions*, *38*(4), 841–860. <https://doi.org/10.1042/BST0380841>
- Halestrap, A. P., & Davidson, A. M. (1990). Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochemical Journal*, *268*(1), 153–160. <https://doi.org/10.1042/bj2680153>
- Halestrap, A. P., & Richardson, A. P. (2015). The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *78*, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.08.018>
- Hall, A. R., Burke, N., Dongworth, R. K., Kalkhoran, S. B., Dyson, A., Vicencio, J. M., Dorn, G. W., Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2016). Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death & Disease*, *7*(5), e2238–e2238. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.139>
- Ham, S. Y., Nam, S. B., Kwak, Y.-L., Kim, T. L., Park, J.-K., & Shim, Y. H. (2019). Age-Related Difference in the Effect of Acute Hyperglycemia on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *The Journals of Gerontology: Series A*. <https://doi.org/10.1093/gerona/gly292>



- Hamilton, S., Terentyeva, R., Clements, R. T., Belevych, A. E., & Terentyev, D. (2021). Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication; implications for cardiac arrhythmia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *156*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.04.002>
- Hamilton, S., Terentyeva, R., Martin, B., Perger, F., Li, J., Stepanov, A., Bonilla, I. M., Knollmann, B. C., Radwański, P. B., Györke, S., Belevych, A. E., & Terentyev, D. (2020). Increased RyR2 activity is exacerbated by calcium leak-induced mitochondrial ROS. *Basic Research in Cardiology*, *115*(4), 38. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0797-z>
- Hamilton, S., Terentyeva, R., Perger, F., & Terentyev, D. (2021). *MCU overexpression evokes disparate dose-dependent effects on mito-ROS and spontaneous Ca<sup>2+</sup> release in hypertrophic rat cardiomyocytes*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00126.2021>
- Han, H., Tan, J., Wang, R., Wan, H., He, Y., Yan, X., Guo, J., Gao, Q., Li, J., Shang, S., Chen, F., Tian, R., Liu, W., Liao, L., Tang, B., & Zhang, Z. (2020). PINK 1 phosphorylates Drp1<sup>S616</sup> to regulate mitophagy-independent mitochondrial dynamics. *EMBO Reports*, *21*(8), e48686. <https://doi.org/10.15252/embr.201948686>
- Han, X.-J., Lu, Y.-F., Li, S.-A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A. C., Takei, K., Matsui, H., & Matsushita, M. (2008). CaM kinase I $\alpha$ -induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *The Journal of Cell Biology*, *182*(3), 573–585. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802164>
- Haushalter, K. J., Schilling, J. M., Song, Y., Sastri, M., Perkins, G. A., Strack, S., Taylor, S. S., & Patel, H. H. (2019). Cardiac ischemia-reperfusion injury induces ROS-dependent loss of PKA regulatory subunit RI $\alpha$ . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *317*(6), H1231–H1242. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00237.2019>
- Haworth, R. A., & Hunter, D. R. (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*(2), 460–467. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2)
- Haworth, R. A., & Hunter, D. R. (2000). Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *32*(1), 91–96. <https://doi.org/10.1023/a:1005568630151>
- He, J., Ford, H. C., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (2017). Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(13), 3409–3414. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702357114>
- Holmuhamedov, E. L., Oberlin, A., Short, K., Terzic, A., & Jahangir, A. (2012). Cardiac Subsarcolemmal and Interfibrillar Mitochondria Display Distinct Responsiveness to Protection by Diazoxide. *PLoS ONE*, *7*(9), e44667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044667>
- Hom, J., Yu, T., Yoon, Y., Porter, G., & Sheu, S.-S. (2010). Regulation of mitochondrial fission by intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat ventricular myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1797*(6), 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.018>
- Hu, J., Zhang, Y., Jiang, X., Zhang, H., Gao, Z., Li, Y., Fu, R., Li, L., Li, J., Cui, H., & Gao, N. (2019). ROS-mediated activation and mitochondrial translocation of CaMKII contributes to Drp1-dependent mitochondrial fission and apoptosis in triple-negative breast cancer cells by isorhamnetin and chloroquine. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *38*(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1201-4>
- Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B. T., Trauger, S. A., Han, W., Hu, Y., Oyeleye, M. O., & Dillmann, W. H. (2009). Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(1), 547–555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808518200>

- Huang, X., Sun, L., Ji, S., Zhao, T., Zhang, W., Xu, J., Zhang, J., Wang, Y., Wang, X., Franzini-Armstrong, C., Zheng, M., & Cheng, H. (2013). Kissing and nanotunneling mediate intermitochondrial communication in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(8), 2846–2851. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300741110>
- Huertas, J. R., Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., Nordsborg, N. B., Martín-Albo, J., Rueda-Robles, A., & Casuso, R. A. (2019). Human muscular mitochondrial fusion in athletes during exercise. *The FASEB Journal*, *33*(11), 12087–12098. <https://doi.org/10.1096/fj.201900365RR>
- Hurst, S., Hoek, J., & Sheu, S.-S. (2017). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and regulation of the permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *49*(1), 27–47. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9672-x>
- Ikeda, Y., Shirakabe, A., Maejima, Y., Zhai, P., Sciarretta, S., Toli, J., Nomura, M., Mihara, K., Egashira, K., Ohishi, M., Abdellatif, M., & Sadoshima, J. (2015). Endogenous Drp1 Mediates Mitochondrial Autophagy and Protects the Heart Against Energy Stress. *Circulation Research*, *116*(2), 264–278. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303356>
- Inserte, J., Hernando, V., & Garcia-Dorado, D. (2012). Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, *96*(1), 23–31. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs232>
- Iribarren, C., Karter, A. J., Go, A. S., Ferrara, A., Liu, J. Y., Sidney, S., & Selby, J. V. (2001). *Glycemic Control and Heart Failure Among Adult Patients With Diabetes*.
- Ishihara, M. (2012). Acute Hyperglycemia in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation Journal*, *76*(3), 563–571. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-1376>
- Ishihara, M., Kojima, S., Sakamoto, T., Kimura, K., Kosuge, M., Asada, Y., Tei, C., Miyazaki, S., Sonoda, M., Tsuchihashi, K., Yamagishi, M., Shirai, M., Hiraoka, H., Honda, T., Ogata, Y., & Ogawa, H. (2009). Comparison of Blood Glucose Values on Admission for Acute Myocardial Infarction in Patients With Versus Without Diabetes Mellitus. *The American Journal of Cardiology*, *104*(6), 769–774. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.04.055>
- Ishihara, N., Eura, Y., & Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science*, *117*(26), 6535–6546. <https://doi.org/10.1242/jcs.01565>
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., & Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO Journal*, *25*(13), 2966–2977. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184>
- Ishihara, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., Mizushima, N., Mihara, K., & Ishihara, N. (2015). Dynamics of Mitochondrial DNA Nucleoids Regulated by Mitochondrial Fission Is Essential for Maintenance of Homogeneously Active Mitochondria during Neonatal Heart Development. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(1), 211–223. <https://doi.org/10.1128/MCB.01054-14>
- Jenner, A., Peña-Blanco, A., Salvador-Gallego, R., Ugarte-Urbe, B., Zollo, C., Ganief, T., Bierlmeier, J., Mund, M., Lee, J. E., Ries, J., Schwarzer, D., Macek, B., & Garcia-Saez, A. J. (2022). DRP1 interacts directly with BAX to induce its activation and apoptosis. *The EMBO Journal*, *41*(8), e108587. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108587>
- Jennings, R. B., Reimer, K. A., & Steenbergen, C. (1991). Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *23*(12), 1383–1395. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(91\)90185-o](https://doi.org/10.1016/0022-2828(91)90185-o)
- Jennings, R. B., Sommers, H. M., Smyth, G. A., Flack, H. A., & Linn, H. (1960). Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of Pathology*, *70*, 68–78.
- Jhun, B. S., O-Uchi, J., Adaniya, S. M., Mancini, T. J., Cao, J. L., King, M. E., Landi, A. K., Ma, H., Shin, M., Yang, D., Xu, X., Yoon, Y., Choudhary, G., Clements, R. T., Mende, U., & Sheu, S. (2018). Protein kinase D activation induces mitochondrial fragmentation and dysfunction in cardiomyocytes. *The Journal of Physiology*, *596*(5), 827–855. <https://doi.org/10.1113/JP275418>

- Jiang, D., Xiao, B., Yang, D., Wang, R., Choi, P., Zhang, L., Cheng, H., & Chen, S. R. W. (2004). RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(35), 13062–13067. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402388101>
- Joiner, M. A., Koval, O. M., Li, J., He, B. J., Allamargot, C., Gao, Z., Luczak, E. D., Hall, D. D., Fink, B. D., Chen, B., Yang, J., Moore, S. A., Scholz, T. D., Strack, S., Mohler, P. J., Sivitz, W. I., Song, L.-S., & Anderson, M. E. (2012). CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*, *491*(7423), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature11444>
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A., & Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(24), 13807–13812. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13807>
- Kaasik, A., Veksler, V., Boehm, E., Novotova, M., Minajeva, A., & Ventura-Clapier, R. (2001). Energetic Crosstalk Between Organelles: Architectural Integration of Energy Production and Utilization. *Circulation Research*, *89*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1161/hh1401.093440>
- Kaftan, E., Marks, A. R., & Ehrlich, B. E. (1996). Effects of Rapamycin on Ryanodine Receptor/Ca<sup>2+</sup>-Release Channels From Cardiac Muscle. *Circulation Research*, *78*(6), 990–997. <https://doi.org/10.1161/01.RES.78.6.990>
- Kaludercic, N., & Di Lisa, F. (2020). Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *7*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00012>
- Kamer, K. J., Grabarek, Z., & Mootha, V. K. (2017). High-affinity cooperative Ca<sup>2+</sup> binding by MICU 1–MICU 2 serves as an on–off switch for the uniporter. *EMBO Reports*, *18*(8), 1397–1411. <https://doi.org/10.15252/embr.201643748>
- Karch, J., Bround, M. J., & Khalil, I. (2019). Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *SCIENCE ADVANCES*.
- Karch, J., Kwong, J. Q., Burr, A. R., Sargent, M. A., Elrod, J. W., Peixoto, P. M., Martinez-Caballero, S., Osinska, H., Cheng, E. H.-Y., Robbins, J., Kinnally, K. W., & Molkenin, J. D. (2013). Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *ELife*, *2*, e00772. <https://doi.org/10.7554/eLife.00772>
- Karch, J., & Molkenin, J. D. (2014). Identifying the components of the elusive mitochondrial permeability transition pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(29), 10396–10397. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410104111>
- Kevin, L. G., Camara, A. K. S., Riess, M. L., Novalija, E., & Stowe, D. F. (2003). Ischemic preconditioning alters real-time measure of O<sub>2</sub> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *284*(2), H566–H574. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00711.2002>
- Kim, D. I., Lee, K. H., Gabr, A. A., Choi, G. E., Kim, J. S., Ko, S. H., & Han, H. J. (2016). Aβ-Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1863*(11), 2820–2834. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.003>
- Kleele, T., Rey, T., Winter, J., Zaganelli, S., Mahecic, D., Perreten Lambert, H., Ruberto, F. P., Nemir, M., Wai, T., Pedrazzini, T., & Manley, S. (2021). Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature*, *593*(7859), 435–439. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03510-6>
- Ko, Y. H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W., & Pedersen, P. L. (2003). Mitochondrial ATP Synthasome. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(14), 12305–12309. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200703200>

- Kobayashi, S., Zhao, F., Zhang, Z., Kobayashi, T., Huang, Y., Shi, B., Wu, W., & Liang, Q. (2020). Mitochondrial Fission and Mitophagy Coordinately Restrict High Glucose Toxicity in Cardiomyocytes. *Frontiers in Physiology*, *11*, 604069. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.604069>
- Kohlhaas, M., Nickel, A. G., & Maack, C. (2017). Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart: Mitochondrial energetics and calcium coupling in the heart. *The Journal of Physiology*, *595*(12), 3753–3763. <https://doi.org/10.1113/JP273609>
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R., & Wallace, D. C. (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, *427*(6973), 461–465. <https://doi.org/10.1038/nature02229>
- Korobova, F., Gauvin, T. J., & Higgs, H. N. (2014). A Role for Myosin II in Mammalian Mitochondrial Fission. *Current Biology*, *24*(4), 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.032>
- Korobova, F., Ramabhadran, V., & Higgs, H. N. (2013). An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science*, *339*(6118), 464–467. <https://doi.org/10.1126/science.1228360>
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science*, *305*(5685), 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>
- Kosiborod, M., Rathore, S. S., Inzucchi, S. E., Masoudi, F. A., Wang, Y., Havranek, E. P., & Krumholz, H. M. (2005). Admission Glucose and Mortality in Elderly Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: Implications for Patients With and Without Recognized Diabetes. *Circulation*, *111*(23), 3078–3086. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.517839>
- Kraegen, E. W., Sowden, J. A., Halstead, M. B., Clark, P. W., Rodnick, K. J., Chisholm, D. J., & JAMES, D. E. (1993). *Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: Fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4.*
- Kuroda, J., Ago, T., Matsushima, S., Zhai, P., Schneider, M. D., & Sadoshima, J. (2010). NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(35), 15565–15570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002178107>
- Kushnir, A., Shan, J., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., & Marks, A. R. (2010). Role of CaMKII $\delta$  phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(22), 10274–10279. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005843107>
- Kuster, G. M., Lancel, S., Zhang, J., Communal, C., Trucillo, M. P., Lim, C. C., Pfister, O., Weinberg, E. O., Cohen, R. A., & Liao, R. (2010). Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion in cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *48*(9), 1182–1187. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.038>
- Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Margreiter, R., Grimm, M., Hagenbuchner, J., & Ausserlechner, M. J. (2019). The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants*, *8*(10), 454. <https://doi.org/10.3390/antiox8100454>
- Kwong, J. Q., Davis, J., Baines, C. P., Sargent, M. A., Karch, J., Wang, X., Huang, T., & Molkenin, J. D. (2014). Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy. *Cell Death & Differentiation*, *21*(8), 1209–1217. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.36>
- Kwong, J. Q., Lu, X., Correll, R. N., Schwaneckamp, J. A., Vagnozzi, R. J., Sargent, M. A., York, A. J., Zhang, J., Bers, D. M., & Molkenin, J. D. (2015). The Mitochondrial Calcium Uniporter Selectively Matches Metabolic Output to Acute Contractile Stress in the Heart. *Cell Reports*, *12*(1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.002>

- Kwong, J. Q., & Molkenin, J. D. (2015). Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart. *Cell Metabolism*, *21*(2), 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.001>
- Laforgia, P. L., Auguadro, C., Bronzato, S., & Durante, A. (2022). The Reduction of Mortality in Acute Myocardial Infarction: From Bed Rest to Future Directions. *International Journal of Preventive Medicine*, *13*, 56. [https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM\\_122\\_20](https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_122_20)
- Lambert, J. P., Luongo, T. S., Tomar, D., Jadiya, P., Gao, E., Zhang, X., Lucchese, A. M., Kolmetzky, D. W., Shah, N. S., & Elrod, J. W. (2019). MCUB Regulates the Molecular Composition of the Mitochondrial Calcium Uniporter Channel to Limit Mitochondrial Calcium Overload During Stress. *Circulation*, *140*(21), 1720–1733. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037968>
- Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, *110*(10), 1364–1390. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243972>
- Leboucher, G. P., Tsai, Y. C., Yang, M., Shaw, K. C., Zhou, M., Veenstra, T. D., Glickman, M. H., & Weissman, A. M. (2012). Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis. *Molecular Cell*, *47*(4), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.041>
- Lee, Y., Min, K., Talbert, E. E., Kavazis, A. N., Smuder, A. J., Willis, W. T., & Powers, S. K. (2012). Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *44*(3), 397–405. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e318231c037>
- Lehnart, S. E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X. H. T., Song, L.-S., Tillman, E. J., Mancarella, S., Coromilas, J., Lederer, W. J., Kass, R. S., & Marks, A. R. (2006). Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(20), 7906–7910. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602133103>
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H. T., Reiken, S., Warriar, S., Belevych, A. E., Harvey, R. D., Richter, W., Jin, S.-L. C., Conti, M., & Marks, A. R. (2005). Phosphodiesterase 4D Deficiency in the Ryanodine-Receptor Complex Promotes Heart Failure and Arrhythmias. *Cell*, *123*(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.030>
- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Moghaddas, S., Hassan, M. O., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2004). Blockade of Electron Transport during Ischemia Protects Cardiac Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 47961–47967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409720200>
- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *57*(1), 535–565. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335>
- Lesnefsky, E. J., Slabe, T. J., Stoll, M. S. K., Minkler, P. E., & Hoppel, C. L. (2001). Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *280*(6), H2770–H2778. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2770>
- Lesnefsky, E. J., Tandler, B., Ye, J., Slabe, T. J., Turkaly, J., & Hoppel, C. L. (1997). Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *273*(3), H1544–H1554. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1544>
- Li, A., Gao, M., Jiang, W., Qin, Y., & Gong, G. (2020). Mitochondrial Dynamics in Adult Cardiomyocytes and Heart Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 584800. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584800>
- Li, J., Zhu, H., Shen, E., Wan, L., Arnold, J. M. O., & Peng, T. (2010). Deficiency of Rac1 Blocks NADPH Oxidase Activation, Inhibits Endoplasmic Reticulum Stress, and Reduces Myocardial Remodeling in a Mouse Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, *59*(8), 2033–2042. <https://doi.org/10.2337/db09-1800>

- Li, Y., Li, Y., Feng, Q., Arnold, M., & Peng, T. (2009). Calpain activation contributes to hyperglycaemia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *84*(1), 100–110. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp189>
- Liang, Q., & Kobayashi, S. (2016). Mitochondrial quality control in the diabetic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *95*, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.025>
- Linas, S. L., Whittenburg, D., & Repine, J. E. (1990). Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *258*(3), F711–F716. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.258.3.F711>
- Liu, J. C., Liu, J., Holmström, K. M., Menazza, S., Parks, R. J., Fergusson, M. M., Yu, Z.-X., Springer, D. A., Halsey, C., Liu, C., Murphy, E., & Finkel, T. (2016). MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent In Vivo Mitochondrial Calcium Overload. *Cell Reports*, *16*(6), 1561–1573. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.011>
- Lokuta, A. J., Meyers, M. B., Sander, P. R., Fishman, G. I., & Valdivia, H. H. (1997). Modulation of Cardiac Ryanodine Receptors by Sorcin. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(40), 25333–25338. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.25333>
- Lopez-Crisosto, C., Pennanen, C., Vasquez-Trincado, C., Morales, P. E., Bravo-Sagua, R., Quest, A. F. G., Chiong, M., & Lavandero, S. (2017). Sarcoplasmic reticulum–mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. *Nature Reviews Cardiology*, *14*(6), 342–360. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.23>
- Lu, S., Liao, Z., Lu, X., Katschinski, D. M., Mercola, M., Chen, J., Heller Brown, J., Molkentin, J. D., Bossuyt, J., & Bers, D. M. (2020). Hyperglycemia Acutely Increases Cytosolic Reactive Oxygen Species via O-linked GlcNAcylation and CaMKII Activation in Mouse Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, *126*(10). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316288>
- Lu, X., Ginsburg, K. S., Kettlewell, S., Bossuyt, J., Smith, G. L., & Bers, D. M. (2013). Measuring Local Gradients of Intramitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in Cardiac Myocytes During Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Release. *Circulation Research*, *112*(3), 424–431. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300501>
- Luo, H., Song, S., Chen, Y., Xu, M., Sun, L., Meng, G., & Zhang, W. (2019). Inhibitor 1 of Protein Phosphatase 1 Regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II to Alleviate Oxidative Stress in Hypoxia-Reoxygenation Injury of Cardiomyocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2019/2193019>
- Luo, M., Guan, X., Luczak, E. D., Lang, D., Kutschke, W., Gao, Z., Yang, J., Glynn, P., Sossalla, S., Swaminathan, P. D., Weiss, R. M., Yang, B., Rokita, A. G., Maier, L. S., Efimov, I. R., Hund, T. J., & Anderson, M. E. (2013). Diabetes increases mortality after myocardial infarction by oxidizing CaMKII. *Journal of Clinical Investigation*, *123*(3), 1262–1274. <https://doi.org/10.1172/JCI65268>
- 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., Tsai, E. J., Molkentin, J. D., Chen, X., Madesh, M., Houser, S. R., & Elrod, J. W. (2017). The mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is essential for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and viability. *Nature*, *545*(7652), 93–97. <https://doi.org/10.1038/nature22082>
- Luongo, T. S., Lambert, J. P., Yuan, A., Zhang, X., Gross, P., Song, J., Shanmughapriya, S., Gao, E., Jain, M., Houser, S. R., Koch, W. J., Cheung, J. Y., Madesh, M., & Elrod, J. W. (2015). The Mitochondrial Calcium Uniporter Matches Energetic Supply with Cardiac Workload during Stress and Modulates Permeability Transition. *Cell Reports*, *12*(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.017>
- Ma, L., Hu, Y., Alperet, D. J., Liu, G., Malik, V., Manson, J. E., Rimm, E. B., Hu, F. B., & Sun, Q. (2023). Beverage consumption and mortality among adults with type 2 diabetes: Prospective cohort study. *BMJ*, e073406. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-073406>
- Maack, C., Cortassa, S., Aon, M. A., Ganesan, A. N., Liu, T., & O'Rourke, B. (2006). Elevated Cytosolic Na<sup>+</sup> Decreases Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake During Excitation–Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation

in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 99(2), 172–182. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000232546.92777.05>

Maack, C., & O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Research in Cardiology*, 102(5), 369–392. <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0666-z>

Makino, A., Suarez, J., Gawlowski, T., Han, W., Wang, H., Scott, B. T., & Dillmann, W. H. (2011). Regulation of mitochondrial morphology and function by O-GlcNAcylation in neonatal cardiac myocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 300(6), R1296–R1302. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00437.2010>

Malli, R., Frieden, M., Trenker, M., & Graier, W. F. (2005). The Role of Mitochondria for Ca<sup>2+</sup> Refilling of the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12114–12122. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409353200>

Mallilankaraman, K., Doonan, P., Cárdenas, C., Chandramoorthy, H. C., Müller, M., Miller, R., Hoffman, N. E., Gandhirajan, R. K., Molgó, J., Birnbaum, M. J., Rothberg, B. S., Mak, D.-O. D., Foskett, J. K., & Madesh, M. (2012). MICU1 Is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake that Regulates Cell Survival. *Cell*, 151(3), 630–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.011>

Malyala, S., Zhang, Y., Strubbe, J. O., & Bazil, J. N. (2019). Calcium phosphate precipitation inhibits mitochondrial energy metabolism. *PLOS Computational Biology*, 15(1), e1006719. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006719>

Maneechote, C., Palee, S., Kerdphoo, S., Jaiwongkam, T., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2020). Pharmacological inhibition of mitochondrial fission attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury in pre-diabetic rats. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114295. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114295>

Mapanga, R. F., Joseph, D., Symington, B., Garson, K.-L., Kimar, C., Kelly-Laubscher, R., & Essop, M. F. (2014). Detrimental effects of acute hyperglycaemia on the rat heart. *Acta Physiologica*, 210(3), 546–564. <https://doi.org/10.1111/apha.12184>

Marx, S. O., Gaburjakova, J., Gaburjakova, M., Henrikson, C., Ondrias, K., & Marks, A. R. (2001). Coupled Gating Between Cardiac Calcium Release Channels (Ryanodine Receptors). *Circulation Research*, 88(11), 1151–1158. <https://doi.org/10.1161/hh1101.091268>

Marx, S. O., Ondrias, K., & Marks, A. R. (1998). Coupled Gating Between Individual Skeletal Muscle Ca<sup>2+</sup> Release Channels (Ryanodine Receptors). *Science*, 281(5378), 818–821. <https://doi.org/10.1126/science.281.5378.818>

Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Yang, Y.-M., Rosemblyt, N., & Marks, A. R. (2001). Phosphorylation-dependent Regulation of Ryanodine Receptors: A Novel Role for Leucine/Isoleucine Zippers. *The Journal of Cell Biology*, 153.

Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., & Marks, A. R. (2000). PKA Phosphorylation Dissociates FKBP12.6 from the Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor): Defective Regulation in Failing Hearts.

Mather, A. N., Crean, A., Abidin, N., Worthy, G., Ball, S. G., Plein, S., & Greenwood, J. P. (2010). Relationship of dysglycemia to acute myocardial infarct size and cardiovascular outcome as determined by cardiovascular magnetic resonance. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 12(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-12-61>

Mathew, V., Gersh, B. J., Williams, B. A., Laskey, W. K., Willerson, J. T., Tilbury, R. T., Davis, B. R., & Holmes, D. R. (2004). Outcomes in Patients With Diabetes Mellitus Undergoing Percutaneous Coronary Intervention in the Current Era: A Report From the Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) Trial. *Circulation*, 109(4), 476–480. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000109693.64957.20>



- Mattie, S., Riemer, J., Wideman, J. G., & McBride, H. M. (2018). A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *Journal of Cell Biology*, 217(2), 507–515. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611194>
- Mears, J. A., Lackner, L. L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., & Hinshaw, J. E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(1), 20–26. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1949>
- Min, C. K., Yeom, D. R., Lee, K.-E., Kwon, H.-K., Kang, M., Kim, Y.-S., Park, Z. Y., Jeon, H., & Kim, D. H. (2012). Coupling of ryanodine receptor 2 and voltage-dependent anion channel 2 is essential for Ca<sup>2+</sup> transfer from the sarcoplasmic reticulum to the mitochondria in the heart. *Biochemical Journal*, 447(3), 371–379. <https://doi.org/10.1042/BJ20120705>
- Miyamae, M., Camacho, S. A., Weiner, M. W., & Figueredo, V. M. (1996). Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> overload in rat hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 271(5), H2145–H2153. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2145>
- Mnatsakanyan, N., Beutner, G., Porter, G. A., Alavian, K. N., & Jonas, E. A. (2017). Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9652-1>
- Mnatsakanyan, N., Llaguno, M. C., Yang, Y., Yan, Y., Weber, J., Sigworth, F. J., & Jonas, E. A. (2019). A mitochondrial megachannel resides in monomeric F1FO ATP synthase. *Nature Communications*, 10(1), 5823. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13766-2>
- Montaigne, D., Marechal, X., Coisne, A., Debry, N., Modine, T., Fayad, G., Potelle, C., El Arid, J.-M., Mouton, S., Sebti, Y., Duez, H., Preau, S., Remy-Jouet, I., Zerimech, F., Koussa, M., Richard, V., Neviere, R., Edme, J.-L., Lefebvre, P., & Staels, B. (2014). Myocardial Contractile Dysfunction Is Associated With Impaired Mitochondrial Function and Dynamics in Type 2 Diabetic but Not in Obese Patients. *Circulation*, 130(7), 554–564. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008476>
- Moore, A. S., Wong, Y. C., Simpson, C. L., & Holzbaur, E. L. F. (2016). Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission–fusion balance within mitochondrial networks. *Nature Communications*, 7(1), 12886. <https://doi.org/10.1038/ncomms12886>
- Moschella, M. C., & Marks, A. R. (1993). *Inositol 1A,5-Trisphosphate Receptor Expression in Cardiac Myocytes*.
- Muhlberg, A. B. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *The EMBO Journal*, 16(22), 6676–6683. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6676>
- Murata, M., Akao, M., O'Rourke, B., & Marbán, E. (2001). Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channels Attenuate Matrix Ca<sup>2+</sup> Overload During Simulated Ischemia and Reperfusion: Possible Mechanism of Cardioprotection. *Circulation Research*, 89(10), 891–898. <https://doi.org/10.1161/hh2201.100205>
- Murphy, A. N., Kelleher, J. K., & Fiskum, G. (1990). Submicromolar Ca<sup>2+</sup> regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10527–10534. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86979-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86979-4)
- Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R. S., DiLisa, F., Dorn, G. W., Kitsis, R. N., Otsu, K., Ping, P., Rizzuto, R., Sack, M. N., Wallace, D., & Youle, R. J. (2016). Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation Research*, 118(12), 1960–1991. <https://doi.org/10.1161/RES.000000000000104>
- Murphy, E., & Steenbergen, C. (2008). Mechanisms Underlying Acute Protection From Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Physiological Reviews*, 88(2), 581–609. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2007>

- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, *417*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., & Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*, *434*(7033), 652–658. <https://doi.org/10.1038/nature03317>
- Neginskaya, M. A., Solesio, M. E., Berezhnaya, E. V., Amodeo, G. F., Mnatsakanyan, N., Jonas, E. A., & Pavlov, E. V. (2019). ATP Synthase C-Subunit-Deficient Mitochondria Have a Small Cyclosporine A-Sensitive Channel, but Lack the Permeability Transition Pore. *Cell Reports*, *26*(1), 11–17.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.033>
- Neubauer, S. (2007). The Failing Heart—An Engine Out of Fuel. *New England Journal of Medicine*, *356*(11), 1140–1151. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>
- Nguyen, B. Y., Ruiz-Velasco, A., Bui, T., Collins, L., Wang, X., & Liu, W. (2019). Mitochondrial function in the heart: The insight into mechanisms and therapeutic potentials. *British Journal of Pharmacology*, *176*(22), 4302–4318. <https://doi.org/10.1111/bph.14431>
- Ni, R., Cao, T., Xiong, S., Ma, J., Fan, G.-C., Lacefield, J. C., Lu, Y., Tissier, S. L., & Peng, T. (2016). Therapeutic inhibition of mitochondrial reactive oxygen species with mito-TEMPO reduces diabetic cardiomyopathy. *Free Radical Biology and Medicine*, *90*, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.013>
- Niccoli, G., Marino, M., Spaziani, C., & Crea, F. (2010). Prevention and treatment of no-reflow. *Acute Cardiac Care*, *12*(3), 81–91. <https://doi.org/10.3109/17482941.2010.498919>
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H.-P., Giardino, I., & Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, *404*(6779), 787–790. <https://doi.org/10.1038/35008121>
- Oda, T., Yang, Y., Uchinoumi, H., Thomas, D. D., Chen-Izu, Y., Kato, T., Yamamoto, T., Yano, M., Cornea, R. L., & Bers, D. M. (2015). Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and calmodulin affinity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *85*, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.009>
- Ong, K. L., Stafford, L. K., McLaughlin, S. A., Boyko, E. J., Vollset, S. E., Smith, A. E., Dalton, B. E., Duprey, J., Cruz, J. A., Hagins, H., Lindstedt, P. A., Aali, A., Abate, Y. H., Abate, M. D., Abbasian, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abbasi-Kangevari, M., Abd ElHafeez, S., Abd-Rabu, R., ... Vos, T. (2023). Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*, *402*(10397), 203–234. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01301-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01301-6)
- Ong, S.-B., Subrayan, S., Lim, S. Y., Yellon, D. M., Davidson, S. M., & Hausenloy, D. J. (2010). Inhibiting Mitochondrial Fission Protects the Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*, *121*(18), 2012–2022. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.906610>
- Osellame, L. D., Singh, A. P., Stroud, D. A., Palmer, C. S., Stojanovski, D., Ramachandran, R., & Ryan, M. T. (2016). Cooperative and independent roles of Drp1 adaptors Mff and MiD49/51 in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science*, *jcs.185165*. <https://doi.org/10.1242/jcs.185165>
- Pacheco, L. S., Lacey, J. V., Martinez, M. E., Lemus, H., Araneta, M. R. G., Sears, D. D., Talavera, G. A., & Anderson, C. A. M. (2020). Sugar-Sweetened Beverage Intake and Cardiovascular Disease Risk in the California Teachers Study. *Journal of the American Heart Association*, *9*(10), e014883. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014883>
- Paillard, M., Csordás, G., Huang, K.-T., Várnai, P., Joseph, S. K., & Hajnóczky, G. (2018). MICU1 Interacts with the D-Ring of the MCU Pore to Control Its Ca<sup>2+</sup> Flux and Sensitivity to Ru360. *Molecular Cell*, *72*(4), 778–785.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.008>

- Paillard, M., Csordás, G., Szanda, G., Golenár, T., Debattisti, V., Bartok, A., Wang, N., Moffat, C., Seifert, E. L., Spät, A., & Hajnóczky, G. (2017). Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell Reports*, *18*(10), 2291–2300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.032>
- Paillard, M., Tubbs, E., Thiebaut, P.-A., Gomez, L., Fauconnier, J., Crola Da Silva, C., Teixeira, G., Mewton, N., Belaidi, E., Durand, A., Abrial, M., Lacampagne, A., Rieusset, J., & Ovize, M. (2013). Depressing Mitochondria-Reticulum Interactions Protects Cardiomyocytes From Lethal Hypoxia-Reoxygenation Injury. *Circulation*, *128*(14), 1555–1565. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001225>
- Palmer, B. S., Hadziahmetovic, M., Veci, T., & Angelos, M. G. (2004). Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation*, *62*(1), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2003.12.027>
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D., & Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(1), 436–441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>
- Pan, X., Liu, J., Nguyen, T., Liu, C., Sun, J., Teng, Y., Fergusson, M. M., Rovira, I. I., Allen, M., Springer, D. A., Aponte, A. M., Gucek, M., Balaban, R. S., Murphy, E., & Finkel, T. (2013). The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature Cell Biology*, *15*(12), 1464–1472. <https://doi.org/10.1038/ncb2868>
- Papanicolaou, K. N., Khairallah, R. J., Ngho, G. A., Chikando, A., Luptak, I., O’Shea, K. M., Riley, D. D., Lugus, J. J., Colucci, W. S., Lederer, W. J., Stanley, W. C., & Walsh, K. (2011). Mitofusin-2 Maintains Mitochondrial Structure and Contributes to Stress-Induced Permeability Transition in Cardiac Myocytes. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(6), 1309–1328. <https://doi.org/10.1128/MCB.00911-10>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., & Ruggiero, F. M. (2004). Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, *94*(1), 53–59. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000109416.56608.64>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Serena, D., & Ruggiero, F. M. (1999). Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(1–2), 42–50. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00032-5)
- Parra, V., Altamirano, F., Hernández-Fuentes, C. P., Tong, D., Kyrychenko, V., Rotter, D., Pedrozo, Z., Hill, J. A., Eisner, V., Lavandero, S., Schneider, J. W., & Rothermel, B. A. (2018). Down Syndrome Critical Region 1 Gene, *Rcan1*, Helps Maintain a More Fused Mitochondrial Network. *Circulation Research*, *122*(6). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311522>
- Pasdois, P., Beauvoit, B., Tariosse, L., Vinassa, B., Bonoron-Adèle, S., & Santos, P. D. (2008). Effect of diazoxide on flavoprotein oxidation and reactive oxygen species generation during ischemia-reperfusion: A study on Langendorff-perfused rat hearts using optic fibers. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *294*(5), H2088–H2097. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01345.2007>
- Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., De Stefani, D., & Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity. *Molecular Cell*, *53*(5), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.013>
- Pell, V. R., Chouchani, E. T., Murphy, M. P., Brookes, P. S., & Krieg, T. (2016). Moving Forwards by Blocking Back-Flow: The Yin and Yang of MI Therapy. *Circulation Research*, *118*(5), 898–906. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306569>

- Peng, T.-I., & Jou, M.-J. (2010). Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload: Peng & Jou. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1201(1), 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x>
- Penna, C., Andreadou, I., Aragno, M., Beauloye, C., Bertrand, L., Lazou, A., Falcão-Pires, I., Bell, R., Zuurbier, C. J., Pagliaro, P., & Hausenloy, D. J. (2020). Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia–reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols. *British Journal of Pharmacology*, 177(23), 5312–5335. <https://doi.org/10.1111/bph.14993>
- Petersen, C. E., Sun, J., Silva, K., Kosmach, A., Balaban, R. S., & Murphy, E. (2023). Increased mitochondrial free Ca<sup>2+</sup> during ischemia is suppressed, but not eliminated by, germline deletion of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter. *Cell Reports*, 42(7), 112735. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112735>
- Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., & Di Lisa, F. (1999). Transient and Long-Lasting Openings of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Can Be Monitored Directly in Intact Cells by Changes in Mitochondrial Calcein Fluorescence. *Biophysical Journal*, 76(2), 725–734. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77239-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77239-5)
- Petrosillo, G., Francesca, M. R., Di Venosa, N., & Paradies, A. G. (2003). Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: Role of reactive oxygen species and cardiolipin. *The FASEB Journal*, 17(6), 714–716. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0729fje>
- Phillips, C. B., Tsai, C.-W., & Tsai, M.-F. (2019). The conserved aspartate ring of MCU mediates MICU1 binding and regulation in the mitochondrial calcium uniporter complex. *ELife*, 8, e41112. <https://doi.org/10.7554/eLife.41112>
- Piper, H. M., Abdallah, Y., & Schäfer, C. (2004). The first minutes of reperfusion: A window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 61(3), 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.12.012>
- Prag, H. A., Murphy, M. P., & Krieg, T. (2023). Preventing mitochondrial reverse electron transport as a strategy for cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 118(1), 34. <https://doi.org/10.1007/s00395-023-01002-4>
- Prosser, B. L., Ward, C. W., & Lederer, W. J. (2011). X-ROS Signaling: Rapid Mechano-Chemo Transduction in Heart. *Science*, 333(6048), 1440–1445. <https://doi.org/10.1126/science.1202768>
- Pyakurel, A., Savoia, C., Hess, D., & Scorrano, L. (2015). Extracellular Regulated Kinase Phosphorylates Mitofusin 1 to Control Mitochondrial Morphology and Apoptosis. *Molecular Cell*, 58(2), 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.021>
- Qi, X., Qvit, N., Su, Y.-C., & Mochly-Rosen, D. (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 3), 789–802. <https://doi.org/10.1242/jcs.114439>
- Qiao, X., Jia, S., Ye, J., Fang, X., Zhang, C., Cao, Y., Xu, C., Zhao, L., Zhu, Y., Wang, L., & Zheng, M. (2017). PTPIP51 regulates mouse cardiac ischemia/reperfusion through mediating the mitochondria-SR junction. *Scientific Reports*, 7(1), 45379. <https://doi.org/10.1038/srep45379>
- Qin, F., Siwik, D. A., Lancel, S., Zhang, J., Kuster, G. M., Luptak, I., Wang, L., Tong, X., Kang, Y. J., Cohen, R. A., & Colucci, W. S. (2013). Hydrogen Peroxide–Mediated SERCA Cysteine 674 Oxidation Contributes to Impaired Cardiac Myocyte Relaxation in Senescent Mouse Heart. *Journal of the American Heart Association*, 2(4), e000184. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000184>
- Qin, Y., Gao, M., Li, A., Sun, J., Liu, B., & Gong, G. (2018). Mitoflash lights single mitochondrial dynamics events in mature cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.068>
- Qin, Y., Li, A., Liu, B., Jiang, W., Gao, M., Tian, X., & Gong, G. (2020). Mitochondrial fusion mediated by fusion promotion and fission inhibition directs adult mouse heart function toward a different direction. *The FASEB Journal*, 34(1), 663–675. <https://doi.org/10.1096/fj.201901671R>

- Quiles, J. M., & Gustafsson, Å. B. (2022). The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology*, *19*(11), 723–736. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00703-y>
- Quinlan, C. L., Goncalves, R. L. S., Hey-Mogensen, M., Yadava, N., Bunik, V. I., & Brand, M. D. (2014). The 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes in Mitochondria Can Produce Superoxide/Hydrogen Peroxide at Much Higher Rates Than Complex I. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(12), 8312–8325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545301>
- Quintana-Cabrera, R., & Scorrano, L. (2023). Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics. *Molecular Cell*, *83*(6), 857–876. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.02.012>
- Raffaello, A., De Stefani, D., Sabbadin, D., Teardo, E., Merli, G., Picard, A., Checchetto, V., Moro, S., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2013). The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *The EMBO Journal*, *32*(17), 2362–2376. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.157>
- Ramachandra, C. J. A., Hernandez-Resendiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Lin, Y.-H., & Hausenloy, D. J. (2020). Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection. *EBioMedicine*, *57*, 102884. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102884>
- Ramesh, V., Sharma, V. K., Sheu, S.-S., & Franzini-Armstrong, C. (1998). Structural Proximity of Mitochondria to Calcium Release Units in Rat Ventricular Myocardium May Suggest a Role in Ca<sup>2+</sup> Sequestration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *853*(1 CARDIAC SARCO), 341–344. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08295.x>
- Rasmussen, T. P., Wu, Y., Joiner, M. A., Koval, O. M., Wilson, N. R., Luczak, E. D., Wang, Q., Chen, B., Gao, Z., Zhu, Z., Wagner, B. A., Soto, J., McCormick, M. L., Kutschke, W., Weiss, R. M., Yu, L., Boudreau, R. L., Abel, E. D., Zhan, F., ... Anderson, M. E. (2015). Inhibition of MCU forces extramitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(29), 9129–9134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504705112>
- Rasola, A., & Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, *50*(3), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.007>
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M., & Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, *56*(5), 786–794. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.56.5.786>
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(9), 566–578. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A., & Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Responses. *Science*, *280*(5370), 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>
- Rizzuto, R., Simpson, A. W. M., Brini, M., & Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, *358*(6384), 325–327. <https://doi.org/10.1038/358325a0>
- Robert, V. (2001). Beat-to-beat oscillations of mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in cardiac cells. *The EMBO Journal*, *20*(17), 4998–5007. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4998>
- Roe, N. D., Thomas, D. P., & Ren, J. (2011). Inhibition of NADPH oxidase alleviates experimental diabetes-induced myocardial contractile dysfunction. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *13*(5), 465–473. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01369.x>
- Rossini, M., & Filadi, R. (2020). Sarcoplasmic Reticulum-Mitochondria Kissing in Cardiomyocytes: Ca<sup>2+</sup>, ATP, and Undisclosed Secrets. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 532. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00532>

- Rottenberg, H., & Hoek, J. B. (2017). The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging Cell*, 16(5), 943–955. <https://doi.org/10.1111/accel.12650>
- Rottenberg, & Marbach. (1990). The Na<sup>+</sup>-independent Ca<sup>2+</sup> efflux system in mitochondria is a Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup> exchange system. *FEBS Letters*, 274(1–2), 65–68. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81330-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81330-Q)
- Rouslin, W. (1983). Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 244(6), H743–H748. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1983.244.6.H743>
- Rouslin, W., Broge, C. W., & Grupp, I. L. (1990). ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 259(6), H1759–H1766. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.6.H1759>
- Ruiz, A., Alberdi, E., & Matute, C. (2018). Mitochondrial Division Inhibitor 1 (mdivi-1) Protects Neurons against Excitotoxicity through the Modulation of Mitochondrial Function and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 3. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00003>
- Ruiz-Meana, M., Fernandez-Sanz, C., & Garcia-Dorado, D. (2010). The SR-mitochondria interaction: A new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovascular Research*, 88(1), 30–39. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq225>
- Ruizmeana, M., Garcadorado, D., Mirocasas, E., Abellan, A., & Solersoler, J. (2006). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion ☆. *Cardiovascular Research*, 71(4), 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.06.019>
- Santulli, G., Lewis, D., des Georges, A., Marks, A. R., & Frank, J. (2018). Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. In J. R. Harris & E. J. Boekema (Eds.), *Membrane Protein Complexes: Structure and Function* (Vol. 87, pp. 329–352). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_11)
- Santulli, G., Nakashima, R., Yuan, Q., & Marks, A. R. (2017). Intracellular calcium release channels: An update: RyRs vs. IP<sub>3</sub>Rs. *The Journal of Physiology*, 595(10), 3041–3051. <https://doi.org/10.1113/JP272781>
- Santulli, G., Xie, W., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2015). Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11389–11394. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513047112>
- Sauvanet, C., Arnauné-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P., & Rojo, M. (2010). Dynamique et morphologie mitochondriales: Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *médecine/sciences*, 26(10), 823–829. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102610823>
- Schäfer, C. (2001). Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovascular Research*, 51(2), 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00282-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00282-6)
- Schaper, J., Meiser, E., & Stämmler, G. (1985). Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. *Circulation Research*, 56(3), 377–391. <https://doi.org/10.1161/01.RES.56.3.377>
- Schieber, M., & Chandel, N. S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schluter, K. D., Schwartz, P., Siegmund, B., & Piper, H. M. (1991). Prevention of the oxygen paradox in hypoxic-reoxygenated hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.2.H416>
- Schömig, A. (1990). Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation*, 82(3 Suppl), II13-22.

- Schrepfer, E., & Scorrano, L. (2016). Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Molecular Cell*, 61(5), 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.022>
- Sciarretta, S., Zhai, P., Shao, D., Zablocki, D., Nagarajan, N., Terada, L. S., Volpe, M., & Sadoshima, J. (2013). Activation of NADPH Oxidase 4 in the Endoplasmic Reticulum Promotes Cardiomyocyte Autophagy and Survival During Energy Stress Through the Protein Kinase RNA-Activated-Like Endoplasmic Reticulum Kinase/Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$ /Activating Transcription Factor 4 Pathway. *Circulation Research*, 113(11), 1253–1264. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301787>
- Sedlic, F., Muravyeva, M. Y., Sepac, A., Sedlic, M., Williams, A. M., Yang, M., Bai, X., & Bosnjak, Z. J. (2017). Targeted Modification of Mitochondrial ROS Production Converts High Glucose-Induced Cytotoxicity to Cytoprotection: Effects on Anesthetic Preconditioning: CYTOTOXICITY BY ACUTE HIGH GLUCOSE. *Journal of Cellular Physiology*, 232(1), 216–224. <https://doi.org/10.1002/jcp.25413>
- Seidlmayer, L. K., Kuhn, J., Berbner, A., Arias-Loza, P.-A., Williams, T., Kaspar, M., Czolbe, M., Kwong, J. Q., Molkenkin, J. D., Heinze, K. G., Dedkova, E. N., & Ritter, O. (2016). Inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated sarcoplasmic reticulum–mitochondrial crosstalk influences adenosine triphosphate production via mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake through the mitochondrial ryanodine receptor in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, 112(1), 491–501. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw185>
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Molecular Cell*, 48(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
- Seshasai, Kaptoge, & Thompson. (2011). Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. *The New England Journal of Medicine*.
- Shao, D., & Tian, R. (2015). Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. In Y. S. Prakash (Ed.), *Comprehensive Physiology* (1st ed., pp. 331–351). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150016>
- Sharma, V. K., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C., & Sheu, S.-S. (n.d.). *Transport of Ca<sup>2+</sup> from Sarcoplasmic Reticulum to Mitochondria in Rat Ventricular Myocytes*.
- Sharp, W. W., Fang, Y. H., Han, M., Zhang, H. J., Hong, Z., Banathy, A., Morrow, E., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2014). Dynamin-related protein 1 (Drp1)-mediated diastolic dysfunction in myocardial ischemia-reperfusion injury: Therapeutic benefits of Drp1 inhibition to reduce mitochondrial fission. *The FASEB Journal*, 28(1), 316–326. <https://doi.org/10.1096/fj.12-226225>
- Shen, E., Li, Y., Li, Y., Shan, L., Zhu, H., Feng, Q., Arnold, J. M. O., & Peng, T. (2009). Rac1 Is Required for Cardiomyocyte Apoptosis During Hyperglycemia. *Diabetes*, 58(10), 2386–2395. <https://doi.org/10.2337/db08-0617>
- Shen, Q., Yamano, K., Head, B. P., Kawajiri, S., Cheung, J. T. M., Wang, C., Cho, J.-H., Hattori, N., Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2014). Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 25(1), 145–159. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0525>
- Sims, M. W., Winter, J., Brennan, S., Norman, R. I., André Ng, G., Squire, I. B., & Rainbow, R. D. (2014). PKC-mediated toxicity of elevated glucose concentration on cardiomyocyte function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 307(4), H587–H597. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00894.2013>
- Singh, R. M., Waqar, T., Howarth, F. C., Adeghate, E., Bidasee, K., & Singh, J. (2018). Hyperglycemia-induced cardiac contractile dysfunction in the diabetic heart. *Heart Failure Reviews*, 23(1), 37–54. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9663-y>
- Skulachev, V. P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01735-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01735-7)



- Slot, J. W., Geuze, H. J., Gigengack, S., James, D. E., & Lienhard, G. E. (1991). Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(17), 7815–7819. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7815>
- Smith, J. S., Coronado, R., & Meissner, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca<sup>2+</sup> and ATP and modulation by Mg<sup>2+</sup>. *The Journal of General Physiology*, *88*(5), 573–588. <https://doi.org/10.1085/jgp.88.5.573>
- Smogorzewski, M., Galfayan, V., & Massry, S. G. (1998). High glucose concentration causes a rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of cardiac myocytes. *Kidney International*, *53*(5), 1237–1243. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00868.x>
- Solaini, G., & Harris, D. A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochemical Journal*, *390*(2), 377–394. <https://doi.org/10.1042/BJ20042006>
- Song, M., & Dorn, G. W. (2015). Mitoconfusion: Noncanonical Functioning of Dynamism Factors in Static Mitochondria of the Heart. *Cell Metabolism*, *21*(2), 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.019>
- Song, M., Mihara, K., Chen, Y., Scorrano, L., & Dorn, G. W. (2015). Mitochondrial Fission and Fusion Factors Reciprocally Orchestrate Mitophagic Culling in Mouse Hearts and Cultured Fibroblasts. *Cell Metabolism*, *21*(2), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.011>
- Sorrentino, A., Borghetti, G., Zhou, Y., Cannata, A., Meo, M., Signore, S., Anversa, P., Leri, A., Goichberg, P., Qanud, K., Jacobson, J. T., Hintze, T. H., & Rota, M. (2017). Hyperglycemia induces defective Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *312*(1), H150–H161. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00737.2016>
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews*, *85*(3), 1093–1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>
- Starkov, A. A., Fiskum, G., Chinopoulos, C., Lorenzo, B. J., Browne, S. E., Patel, M. S., & Beal, M. F. (2004). Mitochondrial  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *The Journal of Neuroscience*, *24*(36), 7779–7788. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004>
- Stoica, R., De Vos, K. J., Paillasson, S., Mueller, S., Sancho, R. M., Lau, K.-F., Vizcay-Barrena, G., Lin, W.-L., Xu, Y.-F., Lewis, J., Dickson, D. W., Petrucelli, L., Mitchell, J. C., Shaw, C. E., & Miller, C. C. J. (2014). ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nature Communications*, *5*(1), 3996. <https://doi.org/10.1038/ncomms4996>
- Suarez, J., Cividini, F., Scott, B. T., Lehmann, K., Diaz-Juarez, J., Diemer, T., Dai, A., Suarez, J. A., Jain, M., & Dillmann, W. H. (2018). Restoring mitochondrial calcium uniporter expression in diabetic mouse heart improves mitochondrial calcium handling and cardiac function. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(21), 8182–8195. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002066>
- Suen, D.-F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & Development*, *22*(12), 1577–1590. <https://doi.org/10.1101/gad.1658508>
- Sun, D., Nguyen, N., DeGrado, T. R., Schwaiger, M., & Brosius, F. C. (1994). Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation*, *89*(2), 793–798. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.89.2.793>
- Szabadkai, G., Simoni, A. M., Bianchi, K., De Stefani, D., Leo, S., Wieckowski, M. R., & Rizzuto, R. (2006). Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1763*(5–6), 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.002>
- Takeuchi, A., & Matsuoka, S. (2021). Physiological and Pathophysiological Roles of Mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchanger, NCLX, in Hearts. *Biomolecules*, *11*(12), 1876. <https://doi.org/10.3390/biom11121876>

- Tang, W. H., Cheng, W. T., Kravtsov, G. M., Tong, X. Y., Hou, X. Y., Chung, S. K., & Chung, S. S. M. (2010). Cardiac contractile dysfunction during acute hyperglycemia due to impairment of SERCA by polyol pathway-mediated oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(3), C643–C653. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00137.2010>
- Terentyev, D., Györke, I., Belevych, A. E., Terentyeva, R., Sridhar, A., Nishijima, Y., Carcache de Blanco, E., Khanna, S., Sen, C. K., Cardounel, A. J., Carnes, C. A., & Györke, S. (2008). Redox Modification of Ryanodine Receptors Contributes to Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Leak in Chronic Heart Failure. *Circulation Research*, 103(12), 1466–1472. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184457>
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Györke, I., Volpe, P., Williams, S. C., & Györke, S. (2003). Calsequestrin determines the functional size and stability of cardiac intracellular calcium stores: Mechanism for hereditary arrhythmia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11759–11764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1932318100>
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Valdivia, H. H., Escobar, A. L., & Györke, S. (2002). Luminal Ca<sup>2+</sup> Controls Termination and Refractory Behavior of Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Cardiac Myocytes. *Circulation Research*, 91(5), 414–420. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000032490.04207.BD>
- Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A., & Balaban, R. S. (2000). Ca<sup>2+</sup> activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: Role of the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 278(2), C423–C435. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C423>
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., Ehses, S., Krause, F., Chan, D. C., Alexander, C., Bauer, C., Youle, R., Langer, T., & Martinou, J.-C. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO Journal*, 28(11), 1589–1600. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.89>
- Tong, M., Mukai, R., Mareedu, S., Zhai, P., Oka, S., Huang, C.-Y., Hsu, C.-P., Yousufzai, F. A. K., Fritzky, L., Mizushima, W., Babu, G. J., & Sadoshima, J. (2023). Distinct Roles of DRP1 in Conventional and Alternative Mitophagy in Obesity Cardiomyopathy. *Circulation Research*, 133(1), 6–21. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.123.322512>
- Tran, D. H., & Wang, Z. V. (2019). Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Journal of the American Heart Association*, 8(12), e012673. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012673>
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E., & Shirihai, O. S. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO Journal*, 27(2), 433–446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
- Van Keuren, A. M., Tsai, C.-W., Balderas, E., Rodriguez, M. X., Chaudhuri, D., & Tsai, M.-F. (2020). Mechanisms of EMRE-Dependent MCU Opening in the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex. *Cell Reports*, 33(10), 108486. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108486>
- Van Steenbergen, A., Balteau, M., Ginion, A., Ferté, L., Battault, S., Ravenstein, C. de M. de, Balligand, J.-L., Daskalopoulos, E.-P., Gilon, P., Despa, F., Despa, S., Vanoverschelde, J.-L., Horman, S., Koepsell, H., Berry, G., Hue, L., Bertrand, L., & Beauloye, C. (2017). Sodium-myoinositol cotransporter-1, SMIT1, mediates the production of reactive oxygen species induced by hyperglycemia in the heart. *Scientific Reports*, 7(1), 41166. <https://doi.org/10.1038/srep41166>
- Vasington, F. D., & Murphy, J. V. (1962). Ca<sup>++</sup> Uptake by Rat Kidney Mitochondria and Its Dependence on Respiration and Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 237(8), 2670–2677. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)73805-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)73805-8)

- Wai, T., García-Prieto, J., Baker, M. J., Merkwirth, C., Benit, P., Rustin, P., Rupérez, F. J., Barbas, C., Ibañez, B., & Langer, T. (2015). Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. *Science*, *350*(6265), aad0116. <https://doi.org/10.1126/science.aad0116>
- Waldeck-Weiermair, M., Jean-Quartier, C., Rost, R., Khan, M. J., Vishnu, N., Bondarenko, A. I., Imamura, H., Malli, R., & Graier, W. F. (2011). Leucine Zipper EF Hand-containing Transmembrane Protein 1 (Letm1) and Uncoupling Proteins 2 and 3 (UCP2/3) Contribute to Two Distinct Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(32), 28444–28455. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244517>
- Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., Yin, J., Wang, W., Mattson, M. P., Kao, J. P. Y., Lakatta, E. G., Sheu, S.-S., Ouyang, K., Chen, J., Dirksen, R. T., & Cheng, H. (2008). Superoxide Flashes in Single Mitochondria. *Cell*, *134*(2), 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.017>
- Wang, Y., Liu, Q., Cai, J., Wu, P., Wang, D., Shi, Y., Huyan, T., Su, J., Li, X., Wang, Q., Wang, H., Zhang, F., Bae, O.-N., & Tie, L. (2022). Emodin prevents renal ischemia-reperfusion injury via suppression of CAMKII/DRP1-mediated mitochondrial fission. *European Journal of Pharmacology*, *916*, 174603. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174603>
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Huang, F., Vest, J. A., Reiken, S. R., Mohler, P. J., Sun, J., Guatimosim, S., Song, L.-S., Rosemblyt, N., D'Armiento, J. M., Napolitano, C., Memmi, M., Priori, S. G., Lederer, W. J., & Marks, A. R. (2003). FKBP12.6 Deficiency and Defective Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function Linked to Exercise-Induced Sudden Cardiac Death. *Cell*, *113*(7), 829–840. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00434-3)
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., Deng, S.-X., Vest, J. A., Cervantes, D., Coromilas, J., Landry, D. W., & Marks, A. R. (2004). Protection from Cardiac Arrhythmia Through Ryanodine Receptor-Stabilizing Protein Calstabin2. *Science*, *304*(5668), 292–296. <https://doi.org/10.1126/science.1094301>
- Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., & Marks, A. R. (2004). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Phosphorylation Regulates the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circulation Research*, *94*(6). <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000125626.33738.E2>
- Wei, L., Salahura, G., Boncompagni, S., Kasischke, K. A., Protasi, F., Sheu, S., & Dirksen, R. T. (2011). Mitochondrial superoxide flashes: Metabolic biomarkers of skeletal muscle activity and disease. *The FASEB Journal*, *25*(9), 3068–3078. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187252>
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(12), 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
- Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1817*(10), 1833–1838. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.033>
- Whelan, R. S., Konstantinidis, K., Wei, A.-C., Chen, Y., Reyna, D. E., Jha, S., Yang, Y., Calvert, J. W., Lindsten, T., Thompson, C. B., Crow, M. T., Gavathiotis, E., Dorn, G. W., O'Rourke, B., & Kitsis, R. N. (2012). Bax regulates primary necrosis through mitochondrial dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(17), 6566–6571. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201608109>
- Wilding, J. R., Joubert, F., De Araujo, C., Fortin, D., Novotova, M., Veksler, V., & Ventura-Clapier, R. (2006). Altered energy transfer from mitochondria to sarcoplasmic reticulum after cytoarchitectural perturbations in mice hearts: Energy transfer depends on heart cytoarchitecture. *The Journal of Physiology*, *575*(1), 191–200. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.114116>
- Williams, G. S. B., Boyman, L., Chikando, A. C., Khairallah, R. J., & Lederer, W. J. (2013). Mitochondrial calcium uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10479–10486. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300410110>

- Wu, Q.-R., Zheng, D.-L., Liu, P.-M., Yang, H., Li, L.-A., Kuang, S.-J., Lai, Y.-Y., Rao, F., Xue, Y.-M., Lin, J.-J., Liu, S.-X., Chen, C.-B., & Deng, C.-Y. (2021). High glucose induces Drp1-mediated mitochondrial fission via the Orai1 calcium channel to participate in diabetic cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Death & Disease*, *12*(2), 216. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03502-4>
- Wu, S., Lu, Q., Ding, Y., Wu, Y., Qiu, Y., Wang, P., Mao, X., Huang, K., Xie, Z., & Zou, M.-H. (2019). Hyperglycemia-Driven Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase  $\alpha 2$  Induces Diabetic Cardiomyopathy by Promoting Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes In Vivo. *Circulation*, *139*(16), 1913–1936. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033552>
- Wu, S., Lu, Q., Wang, Q., Ding, Y., Ma, Z., Mao, X., Huang, K., Xie, Z., & Zou, M.-H. (2017). Binding of FUN14 Domain Containing 1 With Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Maintains Mitochondrial Dynamics and Function in Hearts in Vivo. *Circulation*, *136*(23), 2248–2266. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030235>
- Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z., & Xing, D. (2011). Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins: Mitochondrial fragmentation caused by HF-LPLI. *FEBS Journal*, *278*(6), 941–954. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08010.x>
- Wu, Y., Rasmussen, T. P., Koval, O. M., Joiner, M. A., Hall, D. D., Chen, B., Luczak, E. D., Wang, Q., Rokita, A. G., Wehrens, X. H. T., Song, L.-S., & Anderson, M. E. (2015). The mitochondrial uniporter controls fight or flight heart rate increases. *Nature Communications*, *6*(1), 6081. <https://doi.org/10.1038/ncomms7081>
- Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G., & Stamler, J. S. (1998). Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation. *Science*, *279*(5348), 234–237. <https://doi.org/10.1126/science.279.5348.234>
- Xu, L., Mann, G., & Meissner, G. (1996). Regulation of Cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  Release Channel (Ryanodine Receptor) by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and Adenine Nucleotides Under Normal and Simulated Ischemic Conditions. *Circulation Research*, *79*(6), 1100–1109. <https://doi.org/10.1161/01.RES.79.6.1100>
- Xu, S., Wang, P., Zhang, H., Gong, G., Gutierrez Cortes, N., Zhu, W., Yoon, Y., Tian, R., & Wang, W. (2016). CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic  $\beta$ -AR stimulation. *Nature Communications*, *7*(1), 13189. <https://doi.org/10.1038/ncomms13189>
- Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D. A., Evans, K. E., & Meissner, G. (2003). Molecular Basis of Calmodulin Binding to Cardiac Muscle  $\text{Ca}^{2+}$  Release Channel (Ryanodine Receptor). *Journal of Biological Chemistry*, *278*(26), 23480–23486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301125200>
- Yan, Y., Liu, J., Wei, C., Li, K., Xie, W., Wang, Y., & Cheng, H. (2008). Bidirectional regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovascular Research*, *77*(2), 432–441. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm047>
- Yang, Z., Laubach, V. E., French, B. A., & Kron, I. L. (2009). Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *137*(3), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.08.056>
- Yang, Z., Tian, Y., Liu, Y., Hennessy, S., Kron, I. L., & French, B. A. (2013). Acute Hyperglycemia Abolishes Ischemic Preconditioning by Inhibiting Akt Phosphorylation: Normalizing Blood Glucose before Ischemia Restores Ischemic Preconditioning. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/329183>
- Yaniv, Y., Juhaszova, M., Nuss, H. B., Wang, S., Zorov, D. B., Lakatta, E. G., & Sollott, S. J. (2010). Matching ATP supply and demand in mammalian heart: In vivo, in vitro, and in silico perspectives. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1188*(1), 133–142. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05093.x>
- Yano, M., Kobayashi, S., Kohno, M., Doi, M., Tokuhisa, T., Okuda, S., Suetsugu, M., Hisaoka, T., Obayashi, M., Ohkusa, T., Kohno, M., & Matsuzaki, M. (2003). FKBP12.6-Mediated Stabilization of Calcium-Release Channel

(Ryanodine Receptor) as a Novel Therapeutic Strategy Against Heart Failure. *Circulation*, 107(3), 477–484. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000044917.74408.BE>

Yano, M., Okuda, S., Oda, T., Tokuhisa, T., Tateishi, H., Mochizuki, M., Noma, T., Doi, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ikeda, Y., Ohkusa, T., Ikemoto, N., & Matsuzaki, M. (2005). Correction of Defective Interdomain Interaction Within Ryanodine Receptor by Antioxidant Is a New Therapeutic Strategy Against Heart Failure. *Circulation*, 112(23), 3633–3643. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.555623>

Yano, M., Yamamoto, T., Kobayashi, S., & Matsuzaki, M. (2009). Role of ryanodine receptor as a Ca<sup>2+</sup> regulatory center in normal and failing hearts. *Journal of Cardiology*, 53(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2008.10.008>

Yao, C.-H., Wang, R., Wang, Y., Kung, C.-P., Weber, J. D., & Patti, G. J. (2019). Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *ELife*, 8, e41351. <https://doi.org/10.7554/eLife.41351>

Yaras, N., Ugur, M., Ozdemir, S., Gurdal, H., Purali, N., Lacampagne, A., Vassort, G., & Turan, B. (2005). Effects of Diabetes on Ryanodine Receptor Ca Release Channel (RyR2) and Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Rat Heart. *Diabetes*, 54(11), 3082–3088. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3082>

Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial Reperfusion Injury. *The New England Journal of Medicine*.

Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*, 337(6098), 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>

Young, L., Renfu, Y., & Raymond, R. (1997). *Low-Flow Ischemia Leads to Translocation of Canine Heart GLUT-4 and GLUT-1 Glucose Transporters to the Sarcolemma In Vivo*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.95.2.415>

Yu, R., Liu, T., Ning, C., Tan, F., Jin, S.-B., Lendahl, U., Zhao, J., & Nistér, M. (2019). The phosphorylation status of Ser-637 in dynamin-related protein 1 (Drp1) does not determine Drp1 recruitment to mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 294(46), 17262–17277. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008202>

Yu, T., Jhun, B. S., & Yoon, Y. (2011). High-Glucose Stimulation Increases Reactive Oxygen Species Production Through the Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(3), 425–437. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3284>

Yu, T., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2653–2658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>

Yu, T., Sheu, S.-S., Robotham, J. L., & Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular Research*, 79(2), 341–351. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn104>

Zaja, I., Bai, X., Liu, Y., Kikuchi, C., Dosenovic, S., Yan, Y., Canfield, S. G., & Bosnjak, Z. J. (2014). Cdk1, PKC $\delta$  and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(4), 710–721. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.144>

Zalk, R., Lehnart, S. E., & Marks, A. R. (2007). Modulation of the Ryanodine Receptor and Intracellular Calcium. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 367–385. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.053105.094237>

Zhang, H., Wang, P., Bisetto, S., Yoon, Y., Chen, Q., Sheu, S.-S., & Wang, W. (2017). A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovascular Research*, 113(2), 160–170. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw212>

- Zhang, N., Yu, H., Liu, T., Zhou, Z., Feng, B., Wang, Y., Qian, Z., Hou, X., & Zou, J. (2023). Bmal1 downregulation leads to diabetic cardiomyopathy by promoting Bcl2/IP3R-mediated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload. *Redox Biology*, *64*, 102788. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102788>
- Zhang, R.-H., Guo, H., Kandadi, M. R., Wang, X.-M., & Ren, J. (2012). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Mediates Glucose Toxicity-Induced Cardiomyocyte Contractile Dysfunction. *Experimental Diabetes Research*, *2012*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/829758>
- Zhao, L., Li, S., Wang, S., Yu, N., & Liu, J. (2015). The effect of mitochondrial calcium uniporter on mitochondrial fission in hippocampus cells ischemia/reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *461*(3), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.066>
- Zhou, Y., Yan, H., Guo, M., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2013). Reactive Oxygen Species in Vascular Formation and Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/374963>
- Zhu, P.-P., Patterson, A., Stadler, J., Seeburg, D. P., Sheng, M., & Blackstone, C. (2004). Intra- and Intermolecular Domain Interactions of the C-terminal GTPase Effector Domain of the Multimeric Dynamin-like GTPase Drp1. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(34), 35967–35974. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404105200>
- Zhu, X., & Zuo, L. (2013). Characterization of oxygen radical formation mechanism at early cardiac ischemia. *Cell Death & Disease*, *4*(9), e787–e787. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.313>
- Zima, A. V., & Blatter, L. A. (2004). Inositol-1,4,5-trisphosphate-dependent Ca<sup>2+</sup> signalling in cat atrial excitation-contraction coupling and arrhythmias: IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> signalling in the heart. *The Journal of Physiology*, *555*(3), 607–615. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058529>
- Zima, A. V., & Mazurek, S. R. (2016). Functional Impact of Ryanodine Receptor Oxidation on Intracellular Calcium Regulation in the Heart. In B. Nilius, P. de Tombe, T. Gudermann, R. Jahn, R. Lill, & O. H. Petersen (Eds.), *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 171 (Vol. 171, pp. 39–62). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/112\\_2016\\_2](https://doi.org/10.1007/112_2016_2)
- Zissimopoulos, S., Docrat, N., & Lai, F. A. (2007). Redox Sensitivity of the Ryanodine Receptor Interaction with FK506-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(10), 6976–6983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607590200>
- Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L.-O., Zweier, J. L., & Sollott, S. J. (2000). *Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS Release: A New Phenomenon Accompanying Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cardiac Myocytes.*
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, *94*(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

## RÉSUMÉ

---

L'hyperglycémie *per se* est reconnue comme un facteur prédictif de la sévérité des lésions cardiaques suite à un infarctus du myocarde. Cependant, les mécanismes cellulaires sous-jacents restent à investiguer. La dynamique mitochondriale, processus décrivant à la fois les changements de morphologie des mitochondries ainsi que leur interaction avec d'autres organites tels que le réticulum, a émergé ces dernières années comme un acteur clé de la sensibilité du cœur à l'ischémie-reperfusion (IR). Néanmoins, son rôle dans les effets délétères de l'hyperglycémie au cours de l'IR n'a jamais été investigué. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse (i) que la sensibilité accrue du cœur à l'IR en condition d'hyperglycémie pouvait s'expliquer par un impact de l'hyperglycémie sur l'interaction complexe entre la dynamique mitochondriale, l'homéostasie calcique cellulaire et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et (ii) que l'activation de Drp1, régulateur majeur de la dynamique mitochondriale, pouvait jouer un rôle central dans ce phénomène. Nous avons pu rapporter dans ce travail de thèse, une augmentation des interactions entre le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries, associée à une fission mitochondriale exacerbée lorsque l'IR est réalisée sur des cœurs isolés perfusés avec une solution hyperglycémique, en comparaison avec une solution normoglycémique. De plus, nous avons observé, sur mitochondries et cardiomyocytes isolés, que l'hyperglycémie est à l'origine d'un cercle vicieux entre surproduction d'ERO d'origine mitochondriale, instabilité du récepteur à la ryanodine et entrée accrue de calcium dans les mitochondries. Cette interaction complexe pourrait contribuer à expliquer l'activation précoce du mPTP observée sur les mitochondries issues de cœurs perfusés avec une solution hyperglycémique ou de cœurs de rats traités à la streptozotocine. Pour finir, de manière intéressante, nous avons rapporté que l'inhibition de Drp1, via l'injection de Mdivi-1 au cours de la phase hyperglycémique, permet de normaliser les troubles de l'homéostasie calcique, la production de ROS, l'activation du mPTP et in fine réduit la sensibilité du cœur à l'IR chez les rats traités à la streptozotocine. En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que l'activation de Drp1 en réponse à l'hyperglycémie entraîne une altération de la dynamique mitochondriale et de l'homéostasie calcique cellulaire, participant à la vulnérabilité accrue du cœur à l'IR.

## ABSTRACT

---

Hyperglycemia increases the heart sensitivity to ischemia-reperfusion (IR), but the underlying cellular mechanisms remain unclear. Mitochondrial dynamics (the processes that govern mitochondrial morphology and their interactions with other organelles, such as the reticulum), has emerged as a key factor in the heart vulnerability to IR. However, it is unknown whether mitochondrial dynamics contributes to hyperglycemia deleterious effect during IR. We hypothesized that (i) the higher heart vulnerability to IR in hyperglycemic conditions could be explained by hyperglycemia effect on the complex interplay between mitochondrial dynamics,  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, and reactive oxygen species (ROS) production; and (ii) the activation of Drp1, a key regulator of mitochondrial dynamics, could play a central role. Using transmission electron microscopy and proteomic analysis, we showed that the interactions between sarcoplasmic reticulum and mitochondria and mitochondrial fission were increased during IR in isolated rat hearts perfused with a hyperglycemic buffer compared with hearts perfused with a normoglycemic buffer. In isolated mitochondria and cardiomyocytes, hyperglycemia increased mitochondrial ROS production and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. This was associated with higher RyR2 instability. These results could contribute to explain the early mPTP activation in mitochondria from isolated hearts perfused with a hyperglycemic buffer and in hearts from streptozotocin-treated rats (to increase the blood glucose). Drp1 inhibition by Mdivi-1 during the hyperglycemic phase, normalized  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, ROS production, mPTP activation, and reduced the heart sensitivity to IR in streptozotocin-treated rats. In conclusion, hyperglycemia-dependent Drp1 activation results in altered mitochondrial dynamics and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis that contribute to the higher heart vulnerability to IR.