



HAL
open science

SELENIUM ET CARDIOPATHIES ISCHEMIQUES : effets d'une supplémentation nutritionnelle chez le rat

Andry Rakotovao

► **To cite this version:**

Andry Rakotovao. SELENIUM ET CARDIOPATHIES ISCHEMIQUES : effets d'une supplémentation nutritionnelle chez le rat. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00420866

HAL Id: tel-00420866

<https://theses.hal.science/tel-00420866>

Submitted on 29 Sep 2009

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

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

UNIVERSITÉ GRENOBLE I - JOSEPH FOURIER

ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement le 3 novembre 2008 par

Andry RAKOTOVAO

**SELENIUM ET CARDIOPATHIES ISCHEMIQUES :
effets d'une supplémentation nutritionnelle chez le rat**

JURY

Mme. le Professeur Danielle FEUVRAY	Université Paris XI
M. le Professeur Hervé BARRE	Université Lyon I
M. le Docteur Stéphane TANGUY	Université Avignon
M. le Professeur Jacques VIRET	CRRSA
M. le Professeur Joël de LEIRIS	Université Grenoble I
M. le Professeur François BOUCHER	Université Grenoble I

Thèse préparée au sein du Laboratoire TIMC-IMAG, équipe PRETA/Cœur & Nutrition
Unité Mixte de Recherche CNRS Université Joseph Fourier UMR 5525

PREFACE

Les travaux de ce mémoire ont bénéficié du soutien financier du **CENTRE EVIAN POUR L'EAU (CEPE) : Prix VOLVIC « Oligo-élément et santé humaine » 2006.**



CENTRE EVIAN POUR L'EAU
Parc d'affaires SILIC
3 rue Saarinen - 94618 RUNGIS Cedex

Les différents travaux de ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire TIMC-PRETA et du laboratoire d'étude des radiopharmaceutiques (LER) de Grenoble dirigé par le Dr Catherine Ghezzi que je tiens à remercier pour son accueil.

J'aimerais souligner le fait que je n'aurais pu mener à bien cette recherche sans la contribution conjointe des sponsors et de l'ensemble des collaborateurs. Un remerciement particulier doit être adressé à mes supérieurs hiérarchiques pour leur solide encadrement, leur patience et leur soutien infaillible. Je remercie chaleureusement le Dr Josiane Arnaud et le Dr Véronique Ducros du département de Biologie Intégrée de l'hôpital Michallon pour leur aimable collaboration.



Institut de recherches
SERVIER



Fondation Robert
Schuman



TIMC-IMAG
équipe PRETA/Cœur & Nutrition
UMR 5525 CNRS-Université
Joseph Fourier

Sélénium et cardiopathies ischémiques : effets d'une supplémentation nutritionnelle chez le rat

Dans le présent travail qui s'inscrit dans le cadre général de la protection du tissu cardiaque, nous avons mis en évidence les effets protecteurs d'un oligo-élément antioxydant, le sélénium, au cours du post-infarctus et tenté d'analyser les mécanismes cellulaires mis en jeu dans cet effet.

Dans une première partie, sur un modèle d'ischémie/reperfusion *ex-vivo*, nous démontrons qu'une alimentation enrichie en sélénium (1,5 mg/kg, *po*) limite significativement les arythmies ventriculaires malignes (AVM) dues à l'ischémie/reperfusion en améliorant le statut rédox cellulaire et en limitant la déphosphorylation de la connexine 43 (Cx43). Cette déphosphorylation, proportionnelle à l'intensité et à la sévérité du stress ischémique, entraîne des anomalies de l'excitabilité myocardique, responsables de l'apparition des AVM. Dans une deuxième partie, nous confirmons cet effet cardioprotecteur *in-vivo*. Dans ces conditions, le sélénium réduit significativement la mortalité due à l'ischémie myocardique et la taille de l'infarctus, et améliore le remodelage cardiaque précoce post-infarctus. Dans la troisième partie, nous montrons que ces effets protecteurs sont associés à une diminution significative du niveau cardiaque de TNF- α et à une amélioration de la capacité antioxydante tissulaire à 8 jours post-infarctus. Enfin, nos résultats montrent que le statut en sélénium est inversement corrélé à la taille de l'infarctus et peut être modulé par l'ischémie/reperfusion.

Le statut préischémique en sélénium semble donc conditionner la sensibilité du myocarde à l'ischémie/reperfusion et déterminer le pronostic post-infarctus.

Mots clés : ischémie/reperfusion myocardique, infarctus du myocarde, remodelage cardiaque, TNF- α , Cx43, stress oxydant, sélénium, nutrition.

Selenium and myocardial infarction: effects of nutritional supplementation in Rats

The present report registered within the general framework of the protection of cardiac tissue. We highlighted the protective effects of an antioxydant trace element, selenium, during the post-infarction and tried to analyze the cellular mechanisms concerned in this effect.

In the first part, using an *ex-vivo* model of ischemia/reperfusion, we showed that an enriched selenium (1,5 mg/kg, *po*) diet limits significantly the malignant ventricular arrhythmias (AVM) due to ischemia/reperfusion by improving the cellular redox status and by limiting the dephosphorylation of the connexin 43 (Cx43). This dephosphorylation, proportional to the intensity and the severity of the ischemic stress, leads to abnormalities in myocardial excitability, involved in the appearance of the AVM. In a second part, we confirmed this cardioprotective effect *in-vivo*. Under these conditions, selenium significantly reduced both the mortality due to myocardial ischemia and the infarct size, and improved cardiac remodeling in early post-infarction. In the third part, we showed that these protective effects are associated with a significant reduction of the cardiac level of TNF- α and with an improvement of the tissue antioxydant capacity measured at 8 day-post-infarction. Lastly, our results showed that the selenium status is conversely correlated with the infarct size and can be modulated by ischemia/reperfusion.

Thus, the preischemic selenium status seems to condition the sensitivity of the myocardium to ischemia/reperfusion and to determine the post-infarction prognosis.

Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. Ischémie/reperfusion myocardique	23
1.1. <u>Données générales</u>	23
1.2. <u>Lésions ischémiques</u>	23
1.3. <u>Syndrome de reperfusion</u>	26
1.3.1. Stunning	26
1.3.2. Troubles du rythme de reperfusion	27
1.3.3. Mort cellulaire	28
1.3.3.1. La nécrose cellulaire	28
1.3.3.2. L'apoptose	28
1.4. <u>Remodelage ventriculaire</u>	29
1.4.1. Expansion de la zone infarctée	29
1.4.2. Hypertrophie-dilatation de la zone saine	30
1.4.3. Processus inflammatoire et rôles du stress oxydant	31
1.4.3.1. Réaction inflammatoire post-ischémique	31
1.4.3.2. Effets cytotoxiques	31
1.4.4. Conclusion sur le remodelage ventriculaire	32
2. Ischémie/reperfusion myocardique et système vasculaire	33
2.1. <u>Données générales</u>	33
2.2. <u>Cellules et fonctions vasculaires</u>	34
2.2.1. Cellules endothéliales	34
2.2.2. Cellules musculaires lisses	34
2.2.3. Rôle du NO	34
2.3. <u>Tonus et réactivité vasculaires</u>	35
2.4. <u>Conséquences vasculaires de l'ischémie/reperfusion myocardique</u>	37
2.4.1. Lésions de reperfusion et réactivité vasculaire	37
2.4.2. Remodelage et réactivité vasculaire	38
2.4.3. NO et Stress oxydant	39
2.5. <u>Conclusion</u>	39
3. Ischémie/reperfusion myocardique et jonctions communicantes : rôle de la connexine	43 40
3.1. <u>Introduction</u>	40
3.2. <u>Définition et caractéristiques</u>	41
3.2.1. Connexine	42
3.2.2. Connexon	43
3.2.3. Jonctions communicantes	43
3.2.4. Hémicanal de gap-junction	43

3.2.5.	Régulation de la jonction de type gap	44
3.3.	<u>Connexine 43 dans le système cardiovasculaire</u>	44
3.3.1.	Tissu cardiaque	44
3.3.2.	Tissu vasculaire	44
3.3.3.	Maladies cardiovasculaires	45
3.3.3.1.	Ischémie myocardique	45
3.3.3.2.	Remodelage ventriculaire	46
3.3.3.3.	Pathologies vasculaires	46
3.3.4.	Cx43 mitochondrial et protection cardiaque Maladies cardiovasculaires	47
3.4.	<u>Conclusion</u>	47
4.	Rôle du stress oxydant.....	48
4.1.	<u>Le stress oxydant</u>	48
4.1.1.	Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	48
4.1.2.	Mécanismes pro-oxydants	48
4.1.3.	Mécanismes anti-oxydants	50
4.1.3.1.	Les défenses enzymatiques	50
4.1.3.2.	Les défenses non-enzymatiques	52
4.2.	<u>Physiopathologie du stress oxydant</u>	54
4.2.1.	Signalisation cellulaire	54
4.2.2.	Effets cytotoxiques des ERO	54
4.2.2.1.	Les acides nucléiques	54
4.2.2.2.	Les protéines	54
4.2.2.3.	Les hydrates de carbone	55
4.2.2.4.	Les lipides	55
4.3.	<u>Le stress oxydant et l'ischémie/reperfusion myocardique</u>	55
4.3.1.	Le stress oxydant dans la cellule cardiaque	55
4.3.3.1.	Lésions ischémiques	55
4.3.3.2.	Syndrome de reperfusion	57
4.3.3.3.	Remodelage ventriculaire	57
4.3.2.	Le stress oxydant dans le système vasculaire	58
5.	Sélénium.....	58
5.1.	<u>Introduction</u>	58
5.2.	<u>Sources et statut en sélénium</u>	59
5.3.	<u>Physiologie et physiopathologie</u>	59
5.3.1.	Sélenoprotéines	59
5.3.1.1.	Glutathion peroxydase	59
5.3.1.2.	Thiorédoxine réductase	59
5.2.2.	Carence	61
5.2.3.	Surcharge	61
5.3.	<u>Ischémie/reperfusion</u>	62
5.4.	<u>Inflammation</u>	63
5.5.	<u>Conclusion sur le sélénium</u>	63
	MÉTHODES GÉNÉRALES.....	65

1. ANIMAUX	67
2. MODELES EXPERIMENTAUX.....	67
2.1. <u>Modèle de cœur isolé perfusé par voie aortique</u>	67
2.1.1. Principe de la perfusion aortique	67
2.1.2. Préparation du cœur	68
2.1.3. Composition du liquide de perfusion	68
2.1.4. Protocole d'ischémie/reperfusion myocardique	68
2.1.5. Evaluations des variables fonctionnelles	69
2.1.6. Protocole d'étude des arytmies de reperfusion	70
2.3. <u>Modèle in vivo d'induction de l'infarctus du myocarde</u>	71
2.3.1. Généralités	71
2.3.2. Protocole chirurgical	71
2.3.3. Protocole d'ischémie/reperfusion myocardique <i>in-vivo</i>	72
2.3.4. Evaluation de la fonction cardiaque <i>in-vivo</i> et surcharge volumique	72
2.3.5. Evaluation de la compliance passive ventriculaire gauche <i>ex vivo</i>	73
2.3.6. Estimation de la géométrie cardiaque sur coupes transversales et mesure de la taille d'infarctus	74
3. DOSAGES BIOCHIMIQUES	76
3.1. <u>Conservation des échantillons</u>	76
3.1.1. Conservation des échantillons tissulaires	76
3.1.2. Conservation des échantillons plasmatiques	76
3.1.3. Préparation des homogénats tissulaires	76
3.2. <u>Dosage des protéines</u>	77
3.3. <u>Dosage d'activité enzymatique</u>	77
3.3.1. Activité superoxyde dismutase	77
3.3.3. Activité catalase	78
3.3.4. Activité glutathion peroxydase	79
3.3.5. Activité Thioredoxine réductase	80
4. WESTERN IMMUNOBLOTTING.....	81
4.1. <u>Préparation des homogénats tissulaires</u>	81
4.2. <u>Electrophorèse et Transfert de protéines sur membrane</u>	82
4.3. <u>Analyse des films d'autoradiographie et expression des résultats</u>	82
5. STATISTIQUES	83
CHAPITRE I	85
1. INTRODUCTION	87
1.1. <u>Troubles du rythme ventriculaire post-ischémiques</u>	87
1.2. <u>Jonction communicante et troubles du rythme cardiaque</u>	87
1.3. <u>Stress oxydant et sélénium</u>	89

2. OBJECTIF DE L'ETUDE	89
3. EFFETS DE LA DUREE DE L'ISCHEMIE ET DE LA REPERFUSION POST-ISCHEMIQUE SUR LE NIVEAU DE DEPHOSPHORYLATION DE LA CONNEXINE43	91
3.1. <u>Introduction</u>	91
3.2. <u>Méthodes</u>	91
3.2.1. Protocole expérimental	91
3.2.2. Rapport GSH/GSSG tissulaire cardiaque	93
3.2.3. Dosage de Cx43 non phosphorylée par Western Immunoblotting	94
3.3. <u>Résultats</u>	94
3.3.1. Validation du modèle de stress ischémique sur cœur isolé perfusé	94
3.3.2. Rapport GSH/GSSG tissulaire cardiaque	98
3.3.3. Niveau de phosphorylation de la Cx43	99
3.4. <u>Conclusion</u>	99
4. EFFETS DU SELENIUM SUR LE NIVEAU DE DEPHOSPHORYLATION DE LA CONNEXINE43: relation avec les arythmies de reperfusion	105
4.1. <u>Introduction</u>	105
4.2. <u>Protocole expérimental</u>	106
4.3. <u>Résultats</u>	106
4.3.1. Validation du modèle de supplémentation en sélénium	106
4.3.2. Arythmies de reperfusion	107
4.3.3. Pool tissulaire en groupement thiol (rapport GSH/GSSG)	107
4.3.4. Niveau de phosphorylation de la Cx43	110
4.4. <u>Conclusion</u>	116
5. DISCUSSION	117
6. CONCLUSION	128
CHAPITRE II	123
1. INTRODUCTION	125
2. OBJECTIF DE L'ETUDE	126
3. GROUPES ET PROTOCOLE EXPERIMENTAUX	127
4. EFFET DU REGIME ALIMENTAIRE SUR LE STATUT EN SELENIUM	129
5. SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE A 8 JOURS POST-REPERFUSION	131
5.1. <u>Introduction</u>	131
5.2. <u>Méthodes</u>	131
5.3. <u>Résultats</u>	133
5.3.1. Arythmies ventriculaires malignes et taux de mortalité liés à l'ischémie/reperfusion	133
5.3.2. Évaluation des paramètres hémodynamiques <i>in-vivo</i>	133

5.3.3. Étude de la compliance passive <i>ex-vivo</i>	135
5.3.4. Analyse <i>post-mortem</i> de la géométrie cardiaque	136
5.4. <u>Conclusion</u>	139
6. SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET REACTIVITE VASCULAIRE	141
6.1. <u>Introduction</u>	141
6.2. <u>Méthodes</u>	141
6.3. <u>Résultats</u>	144
6.3.1. Effet du sélénium sur la réponse vasculaire au chlorure de potassium	144
6.3.2. Effet du sélénium sur la contraction vasculaire induite par la phényléphrine	145
6.3.3. Effet du sélénium sur la relaxation vasculaire induite par l'acétylcholine	145
6.3.4. Effet du sélénium sur la relaxation au nitroprussiate de sodium	146
6.4. <u>Conclusion</u>	146
7. DISCUSSION	149
8. CONCLUSION	155
CHAPITRE III.....	157
1. INTRODUCTION	159
2. OBJECTIF DE L'ETUDE	161
3. METHODES	162
4. RESULTATS	165
4.1. <u>Activité des enzymes antioxydantes cardiaques</u>	165
4.2. <u>Niveau d'expression myocardique du TNF-α</u>	166
4.3. <u>Statut et niveau de déphosphorylation de la Cx43</u>	167
5. DISCUSSION	171
6. CONCLUSION.....	179
CHAPITRE IV.....	181
1. INTRODUCTION	183
2. METHODES	184
3. RESULTATS.....	185
3.1. <u>Effet de l'infarctus du myocarde sur la fonction cardiaque mesurée à 8 jours de reperfusion</u>	186
3.2. <u>Effet de l'infarctus du myocarde sur le statut plasmatique en sélénium et en oligo-élément essentiels</u>	188
3.3. <u>Effet de l'infarctus du myocarde sur la capacité antioxydante cardiaque</u>	189
3.4. <u>Statut plasmatique en sélénium, taille de l'infarctus et indices morphométriques</u>	190
4. DISCUSSION	195
5. CONCLUSION	201

CONCLUSION GÉNÉRALE203

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES207

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX229

Liste des abréviations

ACH : acétylcholine
ACE : enzyme de conversion
ACG : artère coronaire gauche
ACH : acétylcholine
AR : arythmies de reperfusion
ATM : aurothiomalate de sodium
ARNm : acide désoxyribosenucléotide messenger
AVM : arythmies ventriculaires malignes
BCA : acide bicinchonique
CE : cellule endothéliale
CML : cellule musculaire lisse
CM : contracture maximale
Cx : connexine
Cx43 : connexine 43
DAG : diacyl glycérol
DAC : délai d'apparition de la contracture
DC : débit coronaire
DMC : délai de mise en contracture maximale
DO : densité optique
DTNB : 5,5'-dithio-bis (2-acide dinitribenzoïque)
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ERN : espèces réactives de l'azote
E-64 : trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino) butane
ES : extrasystole
EMS : épaisseur moyenne du septum
EVD : épaisseur moyenne de la paroi libre du ventricule droit
EVG : épaisseur minimale de la paroi libre du ventricule gauche
FC : fréquence cardiaque
FV : fibrillation ventriculaire
- **FVI** : fibrillation ventriculaire irréversible
- **FVR** : fibrillation ventriculaire réversible
GCs : guanylate cyclase soluble
GMP_C : cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate
GSH : glutathion réduit
GSH-Px : glutathion peroxydase
GSSG : glutathion oxydé
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
4-HNE : 4 hydroxynonhenal
ID : indice de dilatation du ventricule gauche
IE : indice d'expansion de l'infarctus
IDM : infarctus du myocarde
IG : ischémie globale
IgG : immunoglobuline
IL1 : interleukine 1
IMAC : inner membrane anion channel
INF γ : interféron gamma
I κ B : inhibiteur de NF- κ B
I κ B : I κ B kinase
IP₃ : inositol 1,4,5-triphosphate
IR : ischémie régionale
IRP : indice de rétrécissement de la paroi infarctie **JCs** : jonctions communicantes

LDH : lactate déshydrogénase
MAPK : mitogen activated protein kinase
MCV : maladies cardiovasculaires
MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine
MLCP : phosphatase de la chaîne légère de la myosine
MLCO2 : chaînes légères régulatrices
M₂VP : 1-méthyl-2-vinylpyridinium trifluorométhanesulfonate
MPA : acide métaphosphorique
NaF : fluorure de sodium
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NaOV : ortho-vanadate de sodium
NF- κ B : nuclear factor kappa B
NIH : National Institutes of Health
NOS : oxide nitrique
- **iNOS** : inductible
- **eNOS** : endothéliale
O₂⁻ : anion superoxyde
ONOO⁻ : anion peroxydinitrite
PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PLC : phospholipase C
± dP/dt : dérivée première maximale positive ou négative de la pression développée
PDev : pression ventriculaire gauche développée
PDst : pression ventriculaire gauche en fin de diastole
PHE : phényléphrine
PI : pourcentage d'inhibition
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PSys : pression ventriculaire gauche en fin de systole
PVDF : polyvinylidene difluoride
RP : résistance au pacing
SEM : erreur standard sur la moyenne
SERCA : réticulum endosarcoplasmique calcium ATPase
SCVG : surface de la cavité ventriculaire gauche
STVG : surface totale du ventricule gauche (cavité + paroi + septum)
SOD : superoxyde dismutase
SNP : nitroprussiate de sodium
t-BHP : tert-butylhydroperoxyde
TMB : tétraméthylbenzidine
TNB : acide 5-thio-2-nitrobenzoic
TNF- α : tumor necrosis factor alpha
TR : thiorédoxine réductase
TV : tachycardie ventriculaire
UA : unité arbitraire
UI : unité international
VM : volume mort
VDst : volume résiduel télédiastolique
VR : vitesse réactionnelle
VOC : canal calcique voltage dépendant
XDH : xanthine deshydrogénase
XO : xanthine oxydase
ZI : zone ischémique : zone infarctée du ventricule gauche
ZN : zone normoperfusée : ventricule droit

Introduction générale

Le sélénium est un micronutriment d'une grande importance en nutrition humaine. Connu d'abord comme un puissant antioxydant, le sélénium exerce beaucoup d'autres fonctions biologiques, ceci grâce à un éventail de protéines auxquelles il est associé (sélénoprotéines). Il intervient, en particulier, dans la protection antioxydante contre les radicaux libres (stress oxydant) impliqués dans certaines maladies chroniques, dans la lutte contre certains cancers ou dans la fonction immunitaire. Elément essentiel de la glutathion peroxydase (GSH-Px), une enzyme antioxydante, son taux cellulaire influence directement l'activité de l'enzyme. Ainsi, la dose recommandée pour couvrir les besoins nutritionnels en sélénium, est actuellement estimée à 55-70µg/jour, une valeur qui permet d'optimiser l'activité plasmatique de la GSH-Px.

C'est un oligo-élément dont la carence est responsable de nombreux troubles pathologiques. A l'opposé, son excès peut entraîner une toxicité parfois mortelle, liée à sa capacité à bloquer les processus d'oxydoréduction cellulaire. Dans le domaine cardiovasculaire, le taux de sélénium sanguin est considéré comme un facteur essentiel pouvant affecter l'évolution des cardiomyopathies, de l'athérosclérose et de l'insuffisance cardiaque. A juste titre, les concentrations en sélénium ont été corrélées au risque d'infarctus du myocarde (IDM) et peuvent influencer l'agrégation plaquettaire, facteur de risque cardiovasculaire. Par ailleurs, la sévérité de l'insuffisance cardiaque a été étroitement corrélée au statut en sélénium. De ce fait, de nombreuses études expérimentales ont été consacrées au rôle du statut en sélénium dans l'incidence et la sévérité des maladies cardiovasculaires (MCV). Certaines, conduites sur des modèles de cœurs isolés de rat soumis à une ischémie/reperfusion, ont mis en évidence des effets cardioprotecteurs de l'augmentation de la prise alimentaire en sélénium et des effets cardiotoxiques d'une carence. Cependant, les résultats obtenus sur les modèles expérimentaux utilisés ne peuvent pas être directement transposés aux pathologies cardiovasculaires des populations humaines et les doses utilisées étaient largement supérieures aux doses nutritionnelles recommandées. Par ailleurs, les résultats de la plupart des études cliniques restent controversés. D'importantes questions concernant le rôle potentiel du sélénium au cours des cardiopathies ischémiques restent donc irrésolues à ce jour.

Sur ces bases, nous nous sommes intéressés au lien qui pourrait exister entre le statut en sélénium et l'évolution d'un IDM *in-vivo*. L'intérêt d'une telle approche est renforcé par le fait que l'apport alimentaire en sélénium dans la plupart des pays industrialisés et plus particulièrement en Europe, est faible et que, dans ces pays, l'incidence en MCV et la morbi-mortalité restent élevées. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement aux effets de l'apport nutritionnel en sélénium, dans les limites des doses nutritionnelles (50-150µg/jour), sur la vulnérabilité du tissu cardiaque à l'ischémie et à la reperfusion post-ischémique.

Parmi les conséquences sévères de l'ischémie et de la reperfusion post-ischémique, l'apparition d'arythmies ventriculaires malignes (AVM) constitue l'une des plus dramatiques car elle est responsable d'une part importante de la mortalité. Dans un premier temps, notre démarche a été de reproduire les résultats obtenus précédemment par Tanguy et coll. (1998) en étudiant les effets d'une supplémentation alimentaire en sélénium sur le développement de ces AVM. Puis, nous avons cherché à vérifier l'implication du statut d'oxydoréduction (statut rédox) et son rôle dans les mécanismes physiopathologique des AVM. Dans ce cadre, nous avons étudié le lien entre le statut rédox et la déphosphorylation des protéines majeures formant les gap junction myocardique, les Cx43. Leur déphosphorylation est en effet l'un des

facteurs de l'étiologie des AVM. Leur implication dans le transit des ions et des petites molécules, la propagation du potentiel d'action entre les cellules font d'elles une cible idéale du découplage cellulaire, à l'origine des troubles graves du rythme cardiaque.

Ensuite, nous avons étudié les effets de la supplémentation en sélénium sur la fonction cardiovasculaire et les altérations morphologiques cardiaques observées durant la phase précoce du post-infarctus *in-vivo*. Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'ischémie/reperfusion par occlusion de l'artère coronaire gauche *in situ*. Ce modèle reproduit les perturbations de la fonction et de la morphologie cardiaques post-infarctus et implique, entre autres, un processus inflammatoire et oxydatif puissant, responsable des perturbations du remodelage ventriculaire. Sur ce modèle, nous avons envisagé le rôle du stress oxydant et du processus inflammatoire dans les effets protecteurs cardiaques que pouvait avoir le sélénium.

Dans le même esprit, nous avons élargi notre étude en envisageant le rôle d'autres éléments métalliques co-facteurs d'enzymes impliquées dans les mécanismes de la défense antiradicalaire. Nous avons voulu vérifier si le statut préischémique en sélénium et en d'autres oligo-éléments essentiels peut influencer sur les altérations fonctionnelles et structurales cardiaques et sur leur évolution dans le post-infarctus.

Synthèse bibliographique

1. ISCHEMIE ET REPERFUSION MYOCARDIQUES

1.1. Données générales

L'ischémie myocardique se définit comme un déséquilibre entre les besoins tissulaires en oxygène et en substrats métabolisables et l'apport vasculaire coronaire en sang artériel. En clinique, elle résulte, le plus souvent, de coronaropathies qui sont généralement de nature obstructive (thrombose, athérome...), mais aussi de spasmes artériels ou d'une réponse inadaptée à un besoin accru en oxygène (effort physique, par exemple). Dans la plupart de ces situations, l'ischémie est régionale, c'est-à-dire qu'elle n'affecte que la zone située en aval de l'obstruction coronaire. Cependant, dans certains processus thérapeutiques comme les interventions chirurgicales nécessitant l'arrêt temporaire de l'activité cardiaque et la mise en place d'une circulation extracorporelle, l'ischémie est globale : elle est imposée à la totalité du myocarde. L'ischémie myocardique conduit à la fois à un apport métabolique inadapté et à une accumulation de déchets du catabolisme cellulaire (H^+ , CO_2 , lactate) qui peuvent exercer par eux-mêmes des effets cytotoxiques.

Les conséquences de l'ischémie dépendent de sa durée, de sa localisation, du développement du réseau coronaire, mais surtout de sa sévérité (présence ou non d'un débit résiduel et valeur de ce débit) (Jennings et Ganote 1974 ; Opie 1991). Le maintien de conditions d'ischémie sévère (importance de la réduction du débit coronaire) sur un tissu comme le myocarde dont le métabolisme requiert un apport important et permanent en substrats à catabolisme oxydatif strict (acides gras libres, lactate) ou très largement oxydatif (glucose) aura des conséquences considérables sur les différentes fonctions cellulaires. De telles situations entraînent rapidement des altérations biochimiques, fonctionnelles et structurales, avec pour conséquences principales une réduction de la capacité d'éjection systolique et des troubles du rythme, et peuvent aboutir à un phénomène de mort cellulaire, l'IDM.

Sans reperfusion, les lésions ischémiques vont en effet évoluer progressivement vers la mort cellulaire. Ensuite, un phénomène naturel de cicatrisation s'installe. Des modifications adaptatives de la taille et de la forme du ventricule gauche, plus communément désignées sous le terme de "remodelage ventriculaire", sont alors observées afin de palier la défaillance contractile du myocarde. A long terme, l'altération de la fonction globale du cœur peut mener à la défaillance cardiaque.

1.2. Lésions ischémiques

L'évolution des altérations causées aux cellules cardiaques est généralement divisée en deux phases (figure 1) (Hearse et de Leiris 1979 ; Mikelson et coll. 1990) qui peuvent être plus ou moins rapides : une phase précoce, qui correspond à une période durant laquelle les lésions occasionnées par l'ischémie sont encore réversibles, si le myocarde est reperfusé (Jennings et coll. 1960) et une phase tardive, où les lésions deviennent irréversibles. La

transition entre ces 2 phases qui dépend des caractéristiques de l'ischémie myocardique incluant la sévérité, la durée ou la température reste difficilement appréciable.

Les premières perturbations cellulaires au cours de l'ischémie sont d'ordre métabolique et affectent principalement le turnover de l'ATP (adénosine triphosphate) (Bricknell et Opie 1978). Ces altérations précoces et réversibles sont caractérisées par un ralentissement (voire un arrêt total) du métabolisme oxydatif qui entraîne une diminution marquée de la production mitochondriale d'ATP. Malgré l'activation de la glycolyse anaérobie, la production d'ATP ne compense que partiellement le déficit énergétique et ne permet pas de couvrir les besoins du myocarde. De plus, du fait de la réduction du débit coronaire, les intermédiaires de la voie glycolytique ainsi que les produits du catabolisme de l'ATP (Adénosine, phosphate inorganique) s'accumulent et entraînent non seulement l'inhibition du cycle de contraction des sarcomères mais aussi une acidose intracellulaire qui va progressivement bloquer la glycolyse et accroître le déficit énergétique. Par ailleurs, l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ , sous l'effet de l'acidose, conduit à l'expulsion des protons vers l'extérieur de la cellule, couplée à une entrée anormale de sodium. Celle-ci est à l'origine d'un déséquilibre osmotique et à l'apparition d'un œdème intracellulaire. Dans ces conditions, le fonctionnement de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui en situation normale expulse le calcium hors de la cellule, s'inverse, ce qui conduit à l'augmentation progressive de la concentration calcique intracellulaire (Buja et coll. 1975 ; Van Echteld et all. 1991). L'ensemble de ces mécanismes concourent à l'entretien d'un état de contracture permanente ainsi qu'à l'apparition d'une dysfonction diastolique au cours de l'ischémie.

La phase tardive des altérations liées à l'ischémie se caractérise par l'apparition de lésions irréversibles. Les perturbations existantes s'aggravent : l'arrêt total de la production d'ATP par la glycolyse anaérobie est associé à une diminution importante du contenu tissulaire en composés énergétiques ce qui contribue à l'amplification de la surcharge calcique via la défaillance des mécanismes énergie-dépendants qui assurent la régulation de l'homéostasie calcique. La surcharge calcique entraîne l'activation d'enzymes dépendantes du calcium telles que protéases et phospholipases. Une désorganisation de l'ultrastructure des myocytes (gonflement des mitochondries, ruptures de la membrane plasmique...) ainsi que des altérations membranaires s'installent alors, entraînant la fuite de nombreux constituants (ions, lactate, enzymes...) vers le compartiment extracellulaire (Jennings et Ganote, 1974 ; Hearse et de Leiris 1979; Feuvray 1981) qui sont ensuite éliminés par la circulation sanguine. Ainsi, la nouvelle répartition des ions de part et d'autre de la membrane (Opie 1991) associée, entre autres, à la fuite de composants mitochondriaux tels que le cytochrome C ou encore de protéines cellulaires incluant les enzymes antioxydantes concourent au développement de la mort cellulaire (nécrose et apoptose).

En résumé, l'association de l'acidose intracellulaire, de l'accumulation des catabolites de l'ATP et de l'accumulation de calcium est le responsable majeur des lésions précoces avec pour principale conséquence, la diminution de l'activité contractile. La sévérité et la progression de l'ischémie et de ses conséquences ne dépendent pas seulement de l'étendue de la déprivation d'oxygène, mais également d'autres facteurs tels que l'accumulation des métabolites et catabolites toxiques et des dysrégulations ioniques. La réduction de l'apport sanguin durant l'ischémie limite en effet l'élimination de ces molécules toxiques ce qui contribue à la sévérité des lésions ischémiques (Hearse 1988 ; 1991 ; Ferrari et coll.1998).

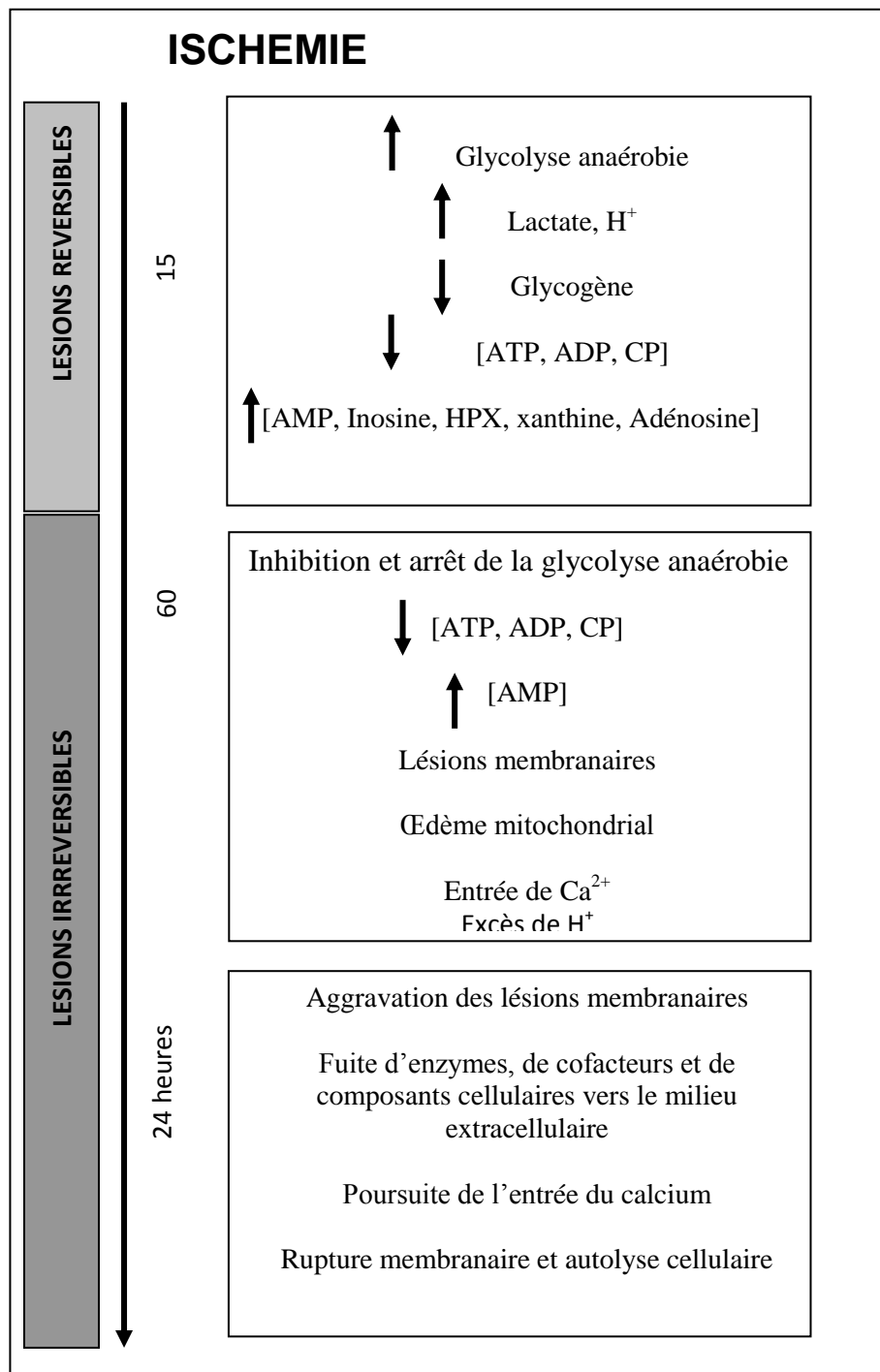


Figure 1: Séquence des altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique (adaptation de Hearse et de Leiris 1979)

ATP = Adénosine triphosphate ; ADP = Adénosine diphosphate ;
 AMP = Adénosine monophosphate ; CP = Phosphocréatine ; HPX =
 Hypoxanthine.

1.3. Syndrome de reperfusion (pour revue, voir Rezkalla et Kloner, 2002, White et Chew 2008)

La principale complication de l'IDM est la perte de masse contractile. Nous avons vu que les cardiomyocytes ne peuvent survivre dans des conditions d'ischémie sévère. Le tissu infarcté n'est plus alors en mesure de se contracter et la fonction globale du cœur peut être sévèrement et irréversiblement altérée. A l'heure actuelle, le moyen le plus couramment utilisé permettant de limiter les conséquences d'une situation de sténose ou d'occlusion coronaire et de restaurer durablement la fonction contractile cardiaque, consiste à revasculariser le plus rapidement possible le territoire ischémié.

Cliniquement, la reperfusion peut être réalisée:

- soit à l'aide d'agents pharmacologiques capables de lyser le thrombus intracoronarien (activateur du plasminogène tissulaire, streptokinase...);
- soit par des techniques d'angioplastie, permettant de déplacer ou d'éliminer mécaniquement la plaque athéroscléreuse obstruant le vaisseau;
- soit par des interventions chirurgicales de pontage coronarien, qui permettent au sang artériel de contourner l'obstruction.

Bien que la reperfusion de la zone ischémiée soit théoriquement bénéfique, elle peut conduire à diverses manifestations physiopathologiques spécifiques constituant le « syndrome de reperfusion » (Jennings et Reimer 1983). Les troubles caractéristiques du syndrome de reperfusion comprennent principalement des arythmies, un dysfonctionnement mécanique durable mais totalement réversible appelé sidération myocardique ou « stunning » et une accélération du processus de nécrose cellulaire. Dans certains cas, l'œdème cellulaire est tel que le diamètre des vaisseaux capillaires de la zone ischémiée est considérablement réduit, ce qui peut-être à l'origine du phénomène de « non-reperfusion » ou « no-reflow ».

1.3.1. Stunning (pour revue, voir Bolli et Marbán, 1999)

Lorsque la reperfusion a lieu avant que l'ischémie n'ait induit des altérations irréversibles, le tissu cardiaque présente une structure normale et récupère ses caractéristiques métaboliques et fonctionnelles pré-ischémiques. Le retour à des caractéristiques fonctionnelles normales a généralement lieu bien après le rétablissement du flux coronaire, et peut nécessiter plusieurs heures, voire quelques jours. Cette hypofonction transitoire ou sidération myocardique a été observée pour la première fois par Heyndrickx et coll. (1975). Son importance clinique reste encore à ce jour controversée. Les principales causes de ce phénomène semblent être les radicaux libres de l'oxygène, la surcharge calcique et une altération du couplage excitation-contraction des cardiomyocytes. L'augmentation de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) pendant l'ischémie peut également aggraver le stunning *via* les effets vasoconstricteurs et inotropes positifs de l'angiotensine II (Ang II).

1.3.2. Troubles du rythme de reperfusion (pour revue, voir Akar et Akar, 2007)

Mises en évidence pour la première fois par Tennant et Wiggers (1935), les arythmies de reperfusion (AR) ont fait l'objet de nombreuses études visant à comprendre leurs mécanismes et leurs conséquences et à développer des méthodes pharmacologiques permettant leur contrôle. En effet, la proportion de mort subite due aux arythmies ne cesse d'augmenter malgré l'efficacité des traitements et la réduction de la mortalité globale associée aux maladies cardiovasculaires.

Ce sont essentiellement des fibrillations ventriculaires (FV) précédées d'épisodes de tachycardie ventriculaire (TV) et d'extrasystoles (ES) et correspondent à des troubles électrophysiologiques pouvant être corrélées à des perturbations de l'homéostasie ionique et plus particulièrement des troubles de l'homéostasie calcique. Si deux phases distinctes d'AR ont pu être caractérisées, aucune différence ne semble apparaître dans les mécanismes précis de ces troubles du rythme qui sont regroupés en :

- un mécanisme électrophysiologique impliquant le découplage et/ou diminution de la conductance des jonctions communicantes au cours de l'ischémie qui serait à l'origine des dysfonctionnements des mouvements ioniques;
- un mécanisme biochimique impliquant la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) au moment de la reperfusion post-ischémique.

L'élévation du Ca^{2+} libre dans le cytosol au moment de la reperfusion peut entraîner des mouvements non contrôlés de cet ion entre les différents compartiments intracellulaires conduisant à des anomalies du potentiel d'action. Il en résulte des battements ectopiques suite à des post-dépolarisations retardées (DAD ou delayed after depolarization) ou précoces (EAD ou early after depolarization) (figure 2). Les post-dépolarisations sont des oscillations du potentiel d'action durant et après la repolarisation qui si elles atteignent la valeur seuil peuvent provoquer une extrasystole. De plus, l'accumulation progressive du potassium dans le milieu extracellulaire au cours de l'ischémie non seulement atténue l'amplitude et la vitesse du potentiel d'action y compris dans les fibres de Purkinje, mais favorise aussi la dépolarisation membranaire. Ces changements entraînent alors une augmentation de la durée du potentiel d'action dans les fibres musculaires et un raccourcissement dans les fibres de Purkinje, conduisant à une conduction anormale du potentiel d'action à l'origine des phénomènes dits de « réentrée ». Ceux-ci sont associés à des courants électriques appelés « circuits », qui conduisent à la ré-excitation d'une zone du myocarde par la même dépolarisation qui l'avait initialement parcourue. Par ailleurs, l'hétérogénéité des lésions ischémiques et de la récupération post-ischémique contribuent à l'inhomogénéité de l'excitabilité électrique pouvant également créer des arythmies de réentrée.

L'autre mécanisme biochimique récemment avancé implique la mitochondrie dont le rôle central dans la mort cellulaire au cours de l'ischémie/reperfusion est largement admis. Il a été suggéré que le potentiel de membrane de la membrane mitochondriale interne qui est fondamental pour la phosphorylation oxydative peut être dissipé par l'ouverture du pore de perméabilité transitoire et/ou du canal anionique de la membrane interne (IMAC) initiée par la surcharge calcique. L'inhibition de la phosphorylation oxydative ainsi que l'ouverture des canaux K_{ATP} du sarcolemme qui s'ensuit résulte en un raccourcissement du potentiel d'action qui par conséquent favorisera le phénomène de réentrée.

Les deux phases de FV semblent avoir lieu respectivement au cours des phases de réversibilité et d'irréversibilité des lésions ischémiques. Les phénomènes de réentrée coïncident avec l'apparition de la phase précoce tandis que les anomalies de conduction

comme les DAD associés à une réentrée semblent plus correspondre aux mécanismes d'AR durant l'établissement de l'IDM ou phase tardive.

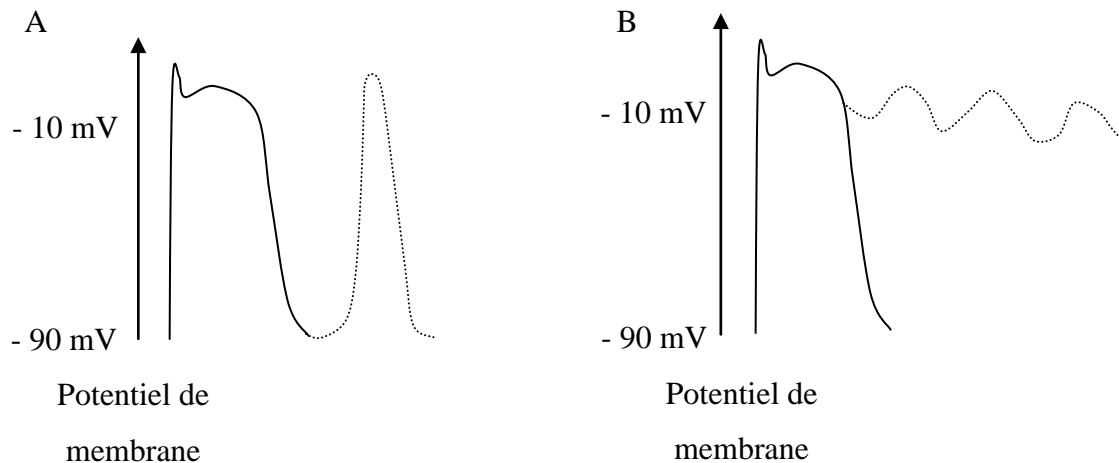


Figure 2 : Différent types de post-dépolarisation participant aux FV.

A= post-dépolarisation retardée atteignant la valeur seuil qui produit une phase de dépolarisation ; B= post-dépolarisation précoce atteignant la valeur seuil qui produit plusieurs phases de dépolarisation. Trait plein= potentiel d'action normal ; trait en pointillets= post-dépolarisation.

1.3.3. Mort cellulaire (pour revue, voir McCully et coll. 2004)

1.3.3.1. La nécrose cellulaire

Lors de la reperfusion, un certain nombre de cardiomyocytes apparemment encore viables peuvent entrer dans un processus de nécrose. Trois hypothèses ont été soulevées pour expliquer l'origine de cette nécrose : le gonflement osmotique des myocytes, la surcharge calcique et les dommages radicalaires. Toutefois, le rôle de la reperfusion dans la mort de certains cardiomyocytes reste encore largement controversé.

1.3.3.2. L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée résulte en une élimination des cellules apoptotiques sans induction de phénomène inflammatoire. Au cours de l'ischémie myocardique, l'activation du programme apoptotique dans les cardiomyocytes contribue au processus de remodelage cardiaque et peut être considérée comme un processus adaptatif des zones hypoperfusées. En effet, la mort par apoptose induit une réorganisation géométrique des cellules cardiaques voisines de celles en processus d'apoptose (réalignement). De plus, la mort sélectionnée de certains cardiomyocytes est moins arythmogène que la mort par nécrose d'un grand territoire myocardique (Brömme et Holtz, 1996).

La mort par apoptose des cellules cardiaques impliquerait le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), un puissant inducteur d'apoptose et les ERO via l'activation du système

Fas-Fas ligand, l'ouverture du pore de perméabilité membranaire et le relargage du cytochrome C mitochondriale lesquels vont activer la cascade de signalisation des caspases. De plus, les ERO sont connus pour activer la protéine p38 MAP kinase et NF-κB, qui sont des éléments clés de la voie de signalisation intracellulaire des macrophages conduisant à la libération de TNF-α (Guyton et coll. 1996). Dans certaines conditions de stress comme c'est le cas du stress oxydant, les macrophages mais également d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, myocytes...) libèrent le TNF-α en quantité importante au niveau de la circulation systémique (Keith et coll. 1998). De nombreux auteurs ont montré une augmentation du taux sérique de TNF-α de façon précoce dans le post-infarctus.

En résumé, il est difficile de préciser si les altérations propres à la reperfusion du myocarde ischémique représentent une accélération des dommages ischémiques ou si elles sont la conséquence de la reperfusion elle-même. Les principaux mécanismes avancés pour expliquer le développement de ces manifestations sont: (i) l'aggravation brutale de l'œdème cellulaire, (ii) l'aggravation de la surcharge calcique, (iii) la libération de catécholamines endogènes, et (iv) les altérations cellulaires liées à la surproduction d'ERO au moment de la reperfusion (Kloner et coll. 1974; Bolli 1991). Toutefois, la surproduction d'ERO au moment de la réadmission de l'oxygène (Zweier et coll. 1987) est susceptible d'interagir avec les autres mécanismes et de les renforcer.

1.4. Remodelage ventriculaire (pour revue, voir Swynghedauw, 2006 ; Opie et coll. 2006)

Le remodelage ventriculaire post-IDM est un phénomène adaptatif d'apparition précoce par lequel le myocarde change structurellement et fonctionnellement afin de maintenir une fonction suffisante. Ensuite, il est évolutif au cours des semaines et des mois suivant l'épisode ischémique aigu. Ce processus touche non seulement la zone infarctée, mais également la zone non infarctée du myocarde. Le remodelage se traduit essentiellement par une augmentation du volume de la cavité ventriculaire gauche, avec d'une part, une expansion de la zone infarctée et d'autre part, une dilatation / hypertrophie de la zone non infarctée.

1.4.1. Expansion de la zone infarctée

La zone infarctée est le siège d'une inflammation importante qui survient dans les premières heures après l'infarctus et qui vise à éliminer les débris nécrotiques et à initier la phase de réparation (cicatrisation). Celle-ci est caractérisée par une prolifération fibroblastique, le dépôt des composants de la matrice extracellulaire et la formation d'un tissu fibreux et nécrotique, au cours desquels, l'augmentation des tensions murales provoque un amincissement et une elongation de ce territoire nécrosé. Ce processus, décrit par Hutchins et Bulkley (1978), a été dénommé « infarct expansion » et se définit par l'association d'un amincissement de la paroi infarctée et d'une dilatation ventriculaire secondaire à l'augmentation des contraintes systoliques et diastoliques.

Les modifications structurales correspondent à des altérations de la disposition myocytaire, survenant conjointement à d'importantes modifications de l'architecture de la matrice extracellulaire qui permettent le glissement des myocytes les uns sur les autres. Selon Weissmann et coll. (1988), plusieurs mécanismes expliquent l'amincissement de la zone nécrosée : rupture cellulaire, réduction de l'espace intercellulaire, élongation des myocytes ou glissement de groupes myocytaires les uns par rapport aux autres.

L'expansion de l'infarctus apparaît précocement dans l'évolution de l'IDM. Les premières études cliniques montrent que l'expansion survient dans les heures suivant l'occlusion coronaire et se prolonge plusieurs mois. Cette expansion ne peut cependant être détectée macroscopiquement qu'après plusieurs jours d'évolution (Erlebacher et coll. 1985). L'expansion de l'infarctus peut conduire à la formation d'un anévrisme voire à la rupture cardiaque et participe de manière importante à la dilatation ultérieure du ventricule gauche.

1.4.2. Hypertrophie-dilatation de la zone saine

Le remodelage du ventricule gauche ne se limite pas à des modifications de géométrie de la zone infarctée. A titre d'exemple, une dilatation de la zone saine du ventricule gauche peut s'observer chez le rat lorsque l'infarctus est compliqué d'expansion (Weissmann et coll. 1988).

Selon Mc Kay et coll. (1986), l'élévation de la pression diastolique et la dilatation précoce du ventricule gauche sont des phénomènes dans un premier temps compensateurs qui permettent de normaliser le volume d'éjection systolique par un mécanisme de Frank-Starling, la dilatation étant essentiellement due à l'augmentation de la contrainte pariétale. Cependant, la dilatation a également des conséquences délétères puisqu'elle augmente le travail des zones myocardiques non infarctées via une élévation des tensions murales (loi de Laplace). Ceci induit de ce fait une amplification de cette dilatation ventriculaire et une baisse de la contractilité. A plus long terme, cette augmentation du volume de la cavité ventriculaire est de très mauvais pronostic et constitue un facteur prédictif de la mortalité post-infarctus (White et coll. 1987).

L'augmentation chronique de la contrainte pariétale aboutit à une hypertrophie pariétale compensatrice des zones saines. Cette hypertrophie, qui tend à normaliser la contrainte pariétale, doit être considérée elle aussi comme un processus d'adaptation initial du ventricule gauche en réponse à la défaillance contractile consécutive à l'IDM. L'augmentation de la masse myocardique est régulière mais d'intensité très variable. Cependant, dans les infarctus transmuraux étendus, elle reste insuffisante et inadaptée (Anversa et coll. 1985), entraînant à la fois une dépression contractile et une diminution de la distensibilité ventriculaire (McKay et coll. 1986).

1.4.3. Processus inflammatoire et rôles du stress oxydant

(pour revue, voir Nian et coll. 2004 ; Frangogiannis 2006 ; Sun 2007)

1.4.3.1. Réaction inflammatoire post-ischémique

La phase précoce du processus inflammatoire post-infarctus est transitoire et indispensable aux mécanismes de réparation du tissu infarci. Dans l'ischémie, l'hypoxie, l'étirement mécanique et surtout le stress oxydant induisent rapidement la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6. L'expression de ces cytokines qui ne sont pas exprimées constitutivement dans le cœur normal a des effets étendus sur le myocarde ischémique. Les changements directs qu'elles entraînent, survie cellulaire ou mort par apoptose, contribuent au remodelage du myocarde (voir plus haut). L'équilibre entre ces deux processus opposés définit le remodelage net du tissu cardiaque. Ensuite, une amplification de la réaction inflammatoire prend place à travers le recrutement de cellules circulantes vers le myocarde lésé fournissant une source additionnelle de production de cytokines localement. Des changements majeurs interviennent à la fin du processus inflammatoire permettant la conversion de la réponse phagocytaire d'élimination des débris de cellules mortes, en un phénomène de réparation tissulaire et de formation d'une cicatrice. La résolution de ce processus inflammatoire par l'inhibition de l'expression continue des médiateurs de l'inflammation et des cytokines après leur pic d'expression précoce et l'arrêt du recrutement leucocytaire est cruciale pour initier ce phénomène de réparation.

1.4.3.2. Effets cytotoxiques

La réponse inflammatoire suite à l'ischémie ou à l'IDM contribue au moins l'altération de la contractilité cardiaque. Dans les cas d'infarctus sévères, les fonctions systolique et diastolique peuvent être immédiatement altérées. Cette baisse des performances cardiaque induit la mise en place de différents mécanismes compensateurs contribuant à maintenir une fraction d'éjection satisfaisante. On observe ainsi une activation neurohormonale intense qui entraîne des effets adaptatifs bénéfiques indiscutables à court terme. A plus long terme, cette persistance de l'activation neurohormonale augmente non seulement les contraintes pariétales imposées à un myocarde défaillant, mais favorise également des troubles du rythme graves et se révèle donc néfaste.

Toutefois, la littérature s'accorde à dire que cette réponse inflammatoire précoce joue un rôle cardioprotecteur durant la phase aiguë de l'IDM (Kurrelmeyer et coll. 2000). De même qu'il est à ce jour admis que la surexpression myocardique de cytokines tel que le TNF- α a des effets délétères en phase plus tardive: (i) en induisant une hypertrophie ou la mort cellulaire pouvant mener à la dilatation chronique et finalement à la mort subite, (ii) en modulant les fonctions des cellules immunitaires et l'intégrité de la matrice extracellulaire.

De plus, ces molécules peuvent affecter de façon directe et indirecte la contractilité myocardique en altérant à la fois la régulation de la concentration intracellulaire calcique et la sensibilité des myofilaments au calcium provoquant ainsi un effet inotrope négatif. Cytokines et neutrophiles jouent également un rôle important dans les lésions de reperfusion post-ischémique. Ils peuvent endommager les cellules cardiaques et vasculaires par des mécanismes impliquant, au moins, la dégradation de la matrice extracellulaire, la sécrétion des métabolites de l'acide arachidonique et des facteurs activateurs de plaquettes et les ERO. L'infiltration leucocytaire, étape importante de l'amplification de la réponse inflammatoire initiale, est en effet à l'origine de lésions cellulaires cardiaques et de l'endothélium vasculaire

participant à la dysfonction contractile précoce. Les leucocytes activés contribuent au phénomène de no-reflow au moment de la reperfusion post-ischémique par l'obstruction de la lumière vasculaire provoquée par leur agrégation d'une part et par l'inhibition de la production de substances vasodilatatrices causée par leur adhésion au niveau de l'endothélium d'autre part.

Les ERO produits essentiellement par les cellules lésées ou immunitaires interviennent dans le processus inflammatoire en augmentant la capacité d'adhésion des leucocytes et la production de cytokines. Elles activent différents gènes et protéines impliqués dans la réparation des lésions cellulaires, la sécrétion de facteurs régulateurs de croissance cellulaire comme le PDGF, ou encore l'activation de la phosphorylation de la PKC, principal médiateur de la protection cellulaire. Cette augmentation de la production d'ERO, principalement de l'anion superoxyde (voir plus haut) entraîne un stress oxydant contribuant aux lésions ischémiques initiales et engendrant un cycle vicieux stress-inflammation-stress. Il a été suggéré que les cytokines induisent non seulement la production des ERO mais qu'elles sont elles-mêmes induites par les ERO.

Par ailleurs, l'induction d'un processus inflammatoire en dehors de cette phase précoce nécessaire à la réparation peut conduire à des effets délétères au niveau du myocarde. Nous venons de voir que l'expression inadaptée de cytokines peut induire des effets myocardiques délétères. Des études récentes suggèrent l'existence d'une seconde phase de processus inflammatoire myocardique post-infarctus (Moro et coll. 2007). Une seconde vague d'amplification de l'expression myocardique du TNF α , ainsi qu'une surproduction d'IL1 β et de facteurs chimioattractants, une semaine post-infarctus ont été rapportées (Ono et coll. 1998 ; Berthonneche et coll. 2004 ; Moro et coll. 2007). Cette observation coïnciderait avec celle d'une seconde bouffée d'apoptose.

1.4.4. Conclusion sur le remodelage ventriculaire

En réponse à l'ischémie ou à l'IDM, des modifications importantes du myocarde au niveau moléculaire ont rapidement lieu sous l'effet d'un certain nombre de voies de signalisation cellulaire incluant des processus inflammatoires et oxydatifs et une activation neurohormonale, cardioprotecteurs aux temps précoces (figure 3). Les modifications de la structure et de la géométrie du ventricule ainsi obtenues contribuent également à maintenir la fonction cardiaque. Ce processus de remodelage qui associe une expansion de la zone infarctée à une hypertrophie / dilatation de la zone non infarctée entraîne à plus long terme des effets néfastes : la dilatation entraîne une augmentation de la tension pariétale et par voie de conséquence une élévation des besoins en oxygène et en énergie du myocarde ; l'hypertrophie, elle aussi coûteuse en oxygène, entraîne une altération de la fonction diastolique et une gêne au remplissage du ventricule gauche. La perte de la masse contractile cardiaque va être progressivement remplacée par un tissu cicatriciel fibreux. Tous ces mécanismes aboutissent au développement de l'insuffisance cardiaque.

Les antioxydants en complément des traitements classiques (β -bloquants ou inhibiteurs des ACE) pourraient atténuer ces mécanismes, notre recherche s'est orientée sur les effets de la modulation du statut antioxydant endogène sur l'expression du TNF- α et de ses conséquences cardiovasculaires (fonction et remodelage) post-infarctus.

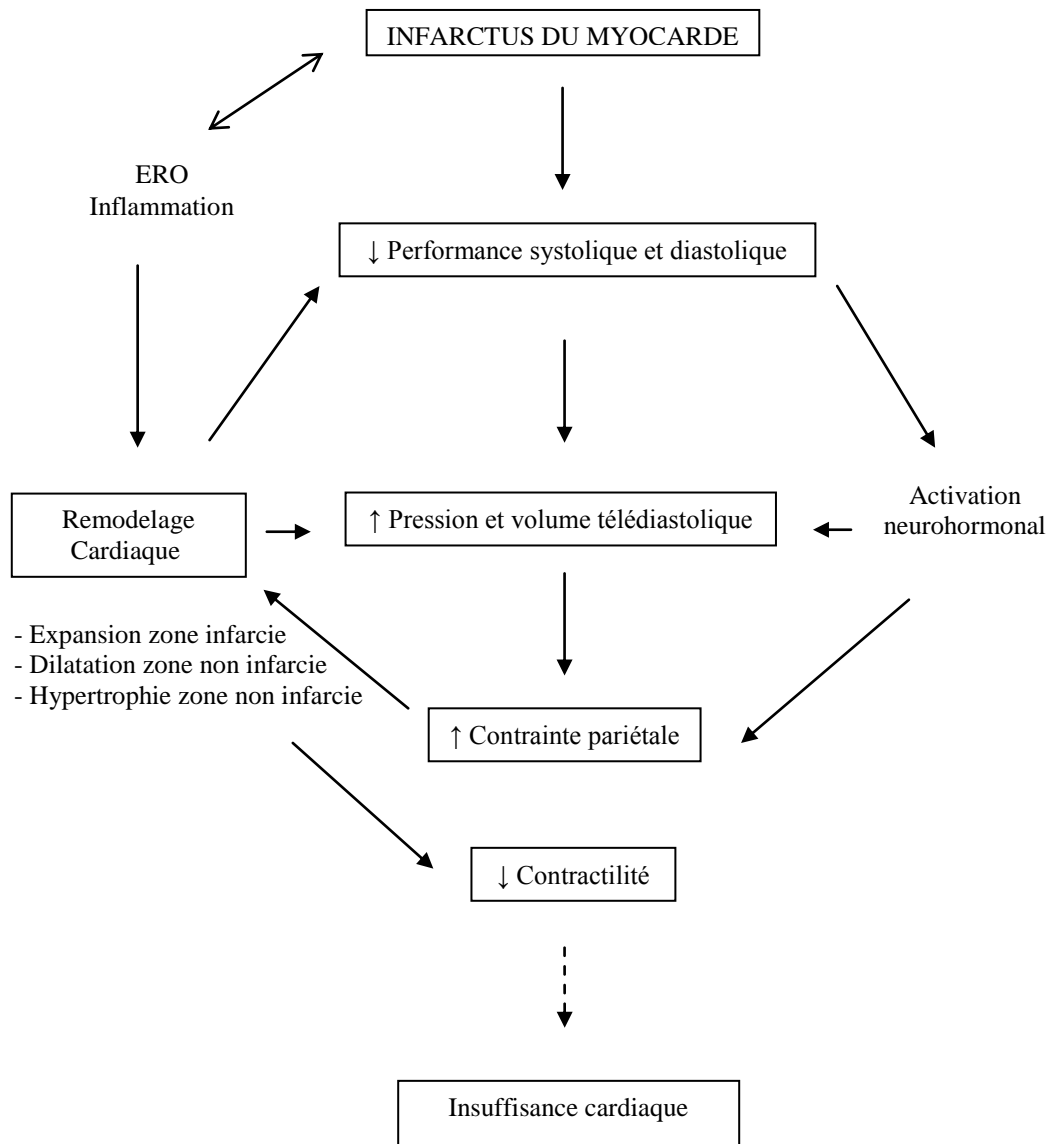


Figure 3 : Mécanismes du remodelage ventriculaire cardiaque gauche post-infarctus.

2. ISCHEMIE/REPERFUSION MYOCARDIQUE ET SYSTEME VASCULAIRE

2.1. Données générales

Une insuffisance coronarienne, à l'origine de l'ischémie myocardique, est souvent due à des lésions du réseau coronaire initiées par une variété de mécanismes pathogéniques qui convergent vers une cible commune : l'altération du fonctionnement des cellules vasculaires : endothéliales (CE), musculaires lisses (CML) et fibroblastes.

Après ischémie/reperfusion, les lésions ischémiques ne se limitent pas au tissu cardiaque. Elles s'étendent également aux cellules vasculaires et plus particulièrement à l'endothélium coronaire (Zweier et Talukder. 2006).

2.2. Cellules et fonctions vasculaires

2.2.1. Rôle des CE

L'endothélium vasculaire qui est situé à l'interface du sang est constamment exposé aux forces physiques et aux molécules de signalisation cellulaires. Il est considéré comme un véritable organe dont le rôle s'étend à diverses fonctions dans les conditions normales et pathologiques, comprenant un contrôle de la fonction vasomotrice, la régulation des transports membranaires et de la coagulation fibrinolytique, la synthèse et la libération de diverses substances, ainsi que la régulation de l'inflammation. Il joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. De ce fait, son dysfonctionnement est impliqué étroitement dans l'établissement et la progression des pathologies vasculaires associées.

2.2.2. Rôle des CML

Elles assurent un rôle essentiel dans les réponses vasculaires. Grâce à leur contraction ou relaxation, elles régulent le débit et le flux sanguin local et la pression artérielle moyenne. Les CML de l'artère l'aorte (classe tonique) ont la capacité de se contracter lentement et de façon soutenue contrairement aux autres CML (de classe phasique) qui ont des contractions rapides et transitoires. Elles réagissent aux neurotransmetteurs comme aux hormones paracrine venant des cellules adjacentes dont les CE.

2.2.3. Rôle du monoxyde d'azote (NO) (pour revue Moncada et Higgs 2006)

Le monoxyde d'azote (NO) est un important médiateur de la relaxation endothélium-dépendante. Il est synthétisé à partir de la L-arginine par l'oxyde nitrique synthétase (NOS) endothéliale constitutive ou inductible (eNOS, iNOS).

- La **eNOS** des CE artérielles est responsable d'une production basale de NO (nanomolaire) qui exerce un effet vasodilatateur permanent. L'activité basale de l'eNOS peut-être stimulée par activation des récepteurs reconnaissant diverses substances relaxantes dont l'acétylcholine (ACH) et les bradykinines. La dilatation induite par le NO compense approximativement la constriction médiée par la stimulation nerveuse sympathique, suggérant que ces deux systèmes sont coordonnés pour adapter rapidement le tonus vasculaire aux besoins de l'organisme.

- La NOS inductible (**iNOS**) est non exprimée dans les conditions physiologiques normales. Elle est induite par les stimuli inflammatoires tels que l'endotoxine, les cytokines, l'interféron gamma (INF γ), l'interleukine 1 (IL-1) et le TNF α au niveau du cytosol des CE,

des CML, ainsi que des macrophages. Lorsqu'elle est exprimée, elle est responsable d'une synthèse importante (micro-molaire) et rapide de NO qui sert de médiateur pour la réponse immunitaire. Cette quantité micromolaire en NO est impliquée notamment dans la pathogenèse de l'inflammation et du choc septique.

Par l'activation directe de la guanylate cyclase soluble (GCs) des CML ou des plaquettes vers lesquelles le radical NO diffuse, il provoque la vasorelaxation. Son activité biologique est due en partie à l'activation des protéines kinases dépendantes du GMPc (cyclic 3'-5'-guanosine monophosphate) qui entraîne l'ouverture des canaux potassiques des cellules vasculaires et le recaptage du calcium intracellulaire, ce qui aboutit par conséquent à la relaxation vasculaire. De plus, le NO régule les interactions entre les plaquettes, les leucocytes et l'endothélium vasculaire en favorisant l'inhibition des plaquettes (pour revue, voir : Thomas et coll. 2003). Il est également impliqué dans la régulation de la contractilité cardiaque. Différents modèles expérimentaux ont montré un effet inotrope négatif du NO (Balligand et coll. 1999 ; Sakar et coll. 2001). Par ailleurs, son inhibition augmente la contractilité des cardiomyocytes en favorisant l'effet des médiateurs constricteurs tels que l'endothéline qui agit en augmentant la force isométrique et en abaissant l'activité de l'ATPase de l'actomyosine.

2.3. Tonus et réactivité vasculaires

Les vaisseaux sanguins changent de diamètre, non seulement de façon passive en fonction des changements de pression sanguine, mais également de façon active par l'activité contractile des CML de leur paroi. Comme dans le cas du muscle strié squelettique, l'activité contractile du muscle lisse est régulée par la concentration calcique intra-cytosolique et par la sensibilité de l'appareil contractile au calcium (Ikebe et coll. 1987 ; Somlyo et Somlyo 1993). Les agents vasorelaxants vont diminuer la concentration calcique cytosolique et désensibiliser le système contractile au calcium, tandis que les agents vasoconstricteurs, au contraire, vont augmenter ces deux paramètres. L'activation des CML nécessite une augmentation importante de la concentration calcique cytosolique.

Dans les CML la concentration cytoplasmique en Ca^{2+} à l'**état de repos** est plus faible (environ 0,1 μ M) que la concentration extracellulaire (voisine de 1 à 2 mM) et que la concentration à l'intérieure des stocks intracellulaires (10 à 15 mM) (majoritairement le réticulum sarcoplasmique) (Van Breemen et Saida 1989).

Ce gradient de Ca^{2+} est maintenu par différents mécanismes de transport :

- Le transport actif de Ca^{2+} vers l'espace extracellulaire par le Ca^{2+} -ATPase du sarcolemme ;
- L'échangeur Na^+/Ca^{2+} : dans les conditions physiologiques normales, l'entrée passive de Na^+ fournit l'énergie nécessaire à la sortie de Ca^{2+} contre son gradient de concentration ;
- Le transport passif vers la matrice mitochondriale : les mitochondries jouent un rôle important dans l'homéostasie calcique uniquement dans les cellules ayant un taux de Ca^{2+} pathologiquement élevé ;
- Le transport vers le noyau : l'enveloppe nucléaire étant directement liée au réticulum sarcoplasmique pourrait jouer un rôle dans le stockage du calcium intracellulaire ;

- Le transport actif vers la lumière du réticulum sarcoplasmique assuré par des ATPases Ca^{2+} -dépendantes du réticulum sarcoplasmique (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase : SERCA).

Cet état de concentration partielle permanent correspond au **tonus vasculaire basal** qui peut être contrôlé à la fois par le système nerveux et par le système hormonal. Le tonus basal est la réponse du muscle à un ensemble de stimuli :

- neurotransmetteurs libérés par les terminaisons nerveuses au niveau de l'adventice et diffusant jusqu'à la média ;
- agents vasomoteurs dérivés de l'endothélium ;
- agents vasoactifs véhiculés par le flux sanguin ;
- facteurs physicochimiques sanguins (pression partielle en O_2 , pH, température...);
- facteurs myogéniques (pression, force de cisaillement...).

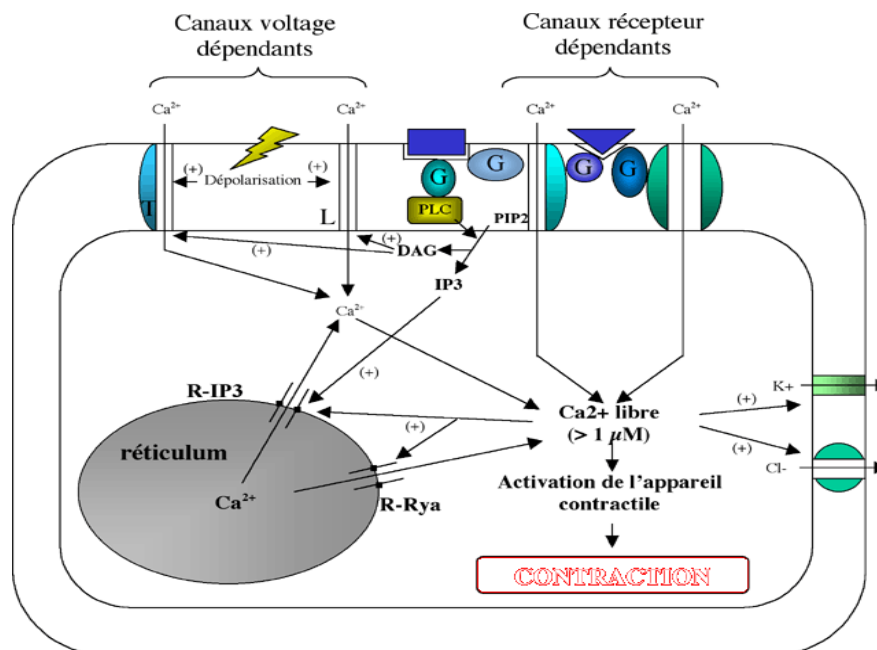


Figure 4 : Mécanismes de couplage excitation-contraction dans le muscle lisse vasculaire.

DAG = diacylglycérol ; G = protéine G ; IP3 = inositol tri phosphate ; PiP2 = hosphatidylinositol di phosphate ; PKC = protéine kinase C ; PLC = phospholipase C ; RIP3 = récepteur canal à l'IP3 ; RRY = récepteur à la ryanodine ; VOC = récepteur voltage dépendant.

(www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/cmlv-a2.htm)

L'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} que nécessite la **contraction des CML vasculaires** est médiée par le Ca^{2+} d'origine extracellulaire et/ou sarcoplasmique (figure 4), suite à une modification du potentiel de membrane (initiation électromécanique) ou au liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique (initiation pharmacomécanique).

Les deux sources de Ca^{2+} agissent en synergie dans le processus de la contraction musculaire et dépendent du mode d'initiation de la contraction. L'ouverture des VOCs permet l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire qui va à son tour entraîner la sortie de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (« calcium-induced calcium-release ») et provoquer la contraction des CML.

Plusieurs mécanismes de ce couplage excitation-contraction ont été proposés. Le plus important met en jeu la voie de l' IP_3 (figure 4). La fixation d'un agoniste vasoconstricteur sur son récepteur couplé à une protéine G conduit à l'activation d'une phospholipase C (PLC) induisant la formation de l' IP_3 et du diacylglycerol (DAG) à partir du phosphatidylinositol bisphosphate (PIP_2) de la bicouche phospholipidique de la membrane (Nishizuka 1995). L' IP_3 libéré va ensuite venir se fixer sur les canaux calciques récepteurs à l' IP_3 , ce qui va ouvrir le canal et libérer le Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (Chadwick et coll. 1990).

La **relaxation des CML** peut se faire par effet d'un vasodilatateur via la diminution de la concentration intracellulaire en calcium (figure 5). Le Ca^{2+} est extrudé soit dans l'espace extracellulaire, soit dans les organelles cellulaires par activation des protéases dépendantes du Ca^{2+} (calpaïne) ou encore des phospholipases ou des endonucléases.

2.4. Conséquences vasculaires de l'ischémie/reperfusion myocardique

(pour revue Zweier et Talukder 2006)

2.4.1. Lésions de reperfusion et réactivité vasculaire

Les besoins métaboliques et la composition intracellulaire des CE, des CML et des cardiomyocytes étant différentes, leur susceptibilité aux dommages de l'ischémie/reperfusion n'est pas la même. Alors qu'une ischémie brève conduit à une évolution simultanée des dommages des CE et des cardiomyocytes, une ischémie prolongée entraîne une dysfonction plus sévère au niveau des CE (Mankad et coll. 1997). Par ailleurs, l'ischémie suivie de reperfusion entraîne une altération marquée de l'ultrastructure de la CE (Keaffer et coll. 1996). Cette altération endothéliale est accompagnée d'une baisse de la relaxation dépendante de l'endothélium des artères coronaires (gros et moyens diamètres) (Ku 1982) sans modifier la relaxation indépendante de l'endothélium, ni celle des CML (Mankand et coll. 1997). L'altération de la réactivité vasculaire ainsi induite est considérée comme une des manifestations du syndrome de reperfusion post-ischémique. Elle n'apparaît qu'à la reperfusion post-ischémique et persiste plusieurs mois après (Lee et coll. 1996).

Les perturbations de la synthèse et de la libération du monoxyde d'azote (NO), un important médiateur de la relaxation endothélium-dépendante, qui découlent des lésions endothéliales ont d'importantes répercussions sur la fonction vasculaire et donc sur la fonction myocardique. Les altérations dans la fonction endothéliale pourront avoir des conséquences défavorables et importantes en termes de modification de perfusion, de risque

de spasme vasculaire, mais également à long terme, de risque de thrombose et d'athérosclérose.

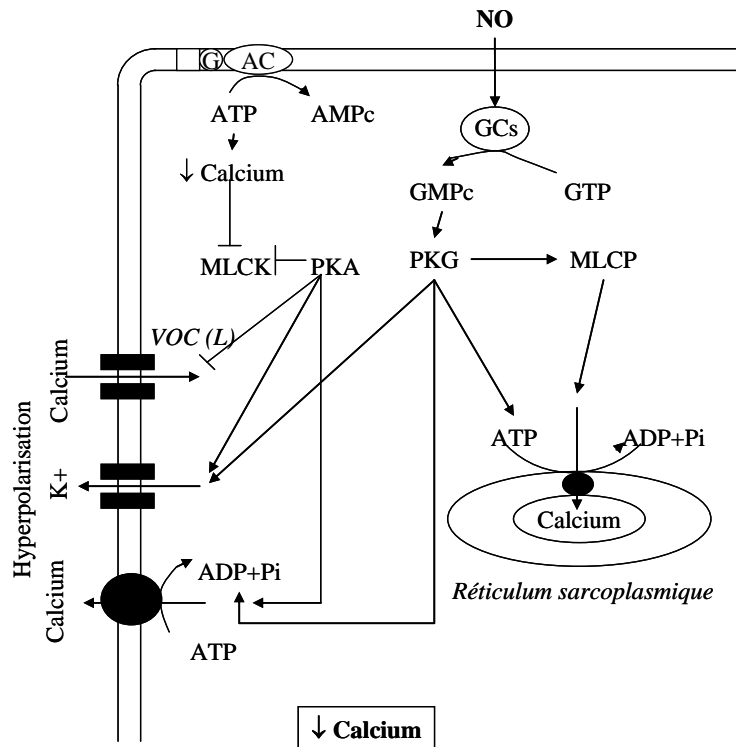


Figure 5 : Mécanismes de relaxation du muscle lisse.

AC = adénylate cyclase ; ADP = adénosine di phosphate ; AMPc = adénosine mo^oNO phosphate cyclique ; ATP = adénosine tri phosphate ; G = protéine G ; GC = guanylate cyclase ; GMP = guanosine mo^oNO phosphate ; GTP = guanosine tri phosphate ; MLCK = kinases des chaînes légères à la myosine ; MLCP = phosphatase des chaînes légères à la myosine ; °NO = oxyde nitrique. Pi = phosphate inorganique ; PKA = protéine kinase A ; PKG = protéine kinase G ; VOC = canaux voltage dépendant.
(d'après la thèse de C. Barandier, 1998)

2.4.4. Remodelage et réactivité vasculaire

En réponse aux lésions affectant la paroi vasculaire et/ou aux modifications chroniques des conditions hémodynamiques consécutives aux désordres cardiovasculaires comme l'ischémie/reperfusion myocardique, un mécanisme de restructuration de la paroi vasculaire s'installe afin de maintenir une fonction vasomotrice adéquate.

Premièrement, les cellules lésées meurent et sont remplacées par les fibroblastes. Successivement les fibroblastes prolifèrent, se différencient puis migrent vers le site de lésion. Durant cette restructuration, les jonctions intercellulaires devant être maintenues durant les contractions vasculaires sont rompues. La dysrégulation de ce remodelage vasculaire entraîne

alors une altération de la réactivité vasculaire qui se manifeste par une augmentation de la contractilité et/ou une détérioration de la relaxation.

Deuxièmement, des modifications chroniques des conditions hémodynamiques induisent un processus de réarrangement des différentes tuniques vasculaires engendrant une modification de l'épaisseur de la paroi et de la compliance vasculaires. Impliquant l'ensemble des cellules vasculaires, ce remodelage vasculaire pathologique contribue à une altération du tonus vasculaire qui à long terme entraîne en une modification de la résistance artérielle périphérique et peut aboutir aux différentes manifestations des maladies vasculaires.

2.4.5. NO et Stress oxydant

L'implication des ERO dans les altérations vasculaires de la reperfusion post-ischémique et leurs effets délétères sur la fonction endothéliale sont aujourd'hui reconnus (Rubanyi 1988 ; Marin et Rodriguez-Martine 1995 ; Conger et Weil 1995). En effet, les vaisseaux, et plus particulièrement l'endothélium vasculaire, constituent la première cible des attaques radicalaires dans diverses situations physiopathologiques impliquant le stress oxydant, thème qui sera traité dans le chapitre 4 « Rôle du stress oxydant ». En particulier, une surproduction d'anions superoxydes (O_2^-) consécutive à l'activité de différentes enzymes (NADPH oxydase, lipooxygénase, myeloperoxydase, etc.) et au modification du fonctionnement de la chaîne de transfert mitochondriale est observée au cours de l'ischémie/reperfusion. De plus, lors de la reperfusion, les lésions cellulaires induisent la libération de fer qui favorise à son tour la formation des ERO en catalysant la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge 1984). Le stress oxydant ainsi induit affecte aussi bien la réactivité vasculaire que la fonction de régulation endothéliale. La production accrue d'ERO va entraîner (i) la diminution de l'activité biologique du NO, (ii) la perturbation de la transduction du signal, (iii) la modification directe de la propriété de contraction des CML et (iii) les lésions et mort cellulaires (figure 6).

2.5. Conclusion sur le système vasculaire

Un nombre important d'études démontrent que le stress oxydant consécutif à l'augmentation de la production d'ERO dans l'espace vasculaire (Zweier et coll. 1987) associée à la baisse des défenses antiradicalaires du tissu vasculaire survenant lors de ces différentes situations, contribue au développement de pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension, les spasmes vasculaires, ainsi que les complications vasculaires du diabète et de l'IDM. Dans le cas de l'inflammation, de l'hypertension artérielle aiguë et plus particulièrement de la reperfusion post-ischémique, la formation des ERO se produit en même temps que des modifications locales du flux sanguin.

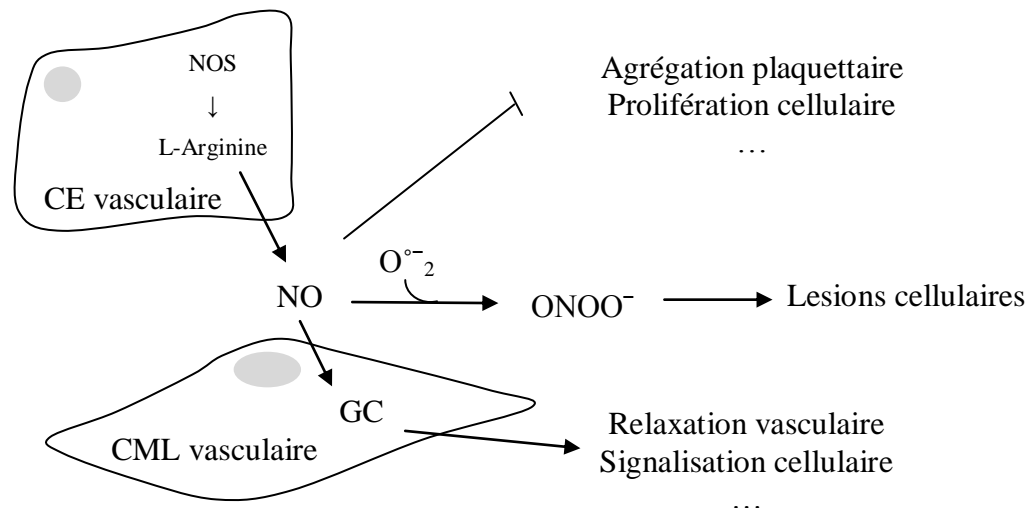


Figure 6 : Inactivation du NO par le radical superoxyde

GC= guanylate cyclase ; NO=monoxyde d'azote ; radical superoxyde ; NOS= NO synthétase.

3. ISCHEMIE/REPERFUSION MYOCARDIQUE ET JONCTIONS COMMUNICANTES : ROLE DE LA CONNEXINE 43

3.1. Introduction

Les gap-junctions ou jonctions communicantes (JCs) sont des canaux transmembranaires typiquement formées par la famille de protéines connexines (Cx). Ces jonctions permettent à des cellules voisines d'échanger directement les ions, métabolites et seconds messagers cytoplasmiques. Ce mécanisme de communication intercellulaire, aussi appelé couplage jonctionnel, est impliqué dans divers processus biologiques tels que le développement, la coordination de la contraction de cellules excitables ou de la mort cellulaire. Au niveau du cœur, les JCs sont impliquées dans le soutien de la conduction et de la fonction cardiaque. En effet, elles permettent un couplage intensif des myocytes ventriculaires leur conférant une activité synchrone. Toutefois, ce couplage peut être rapidement compromis lors des lésions ou des maladies cardiaques et a été incriminé dans l'établissement des troubles du rythme cardiaque post-infarctus. Toutes anomalies touchant le fonctionnement, la synthèse ou la distribution des Cx contribuent directement à l'établissement des désordres touchant la rythmicité des cellules cardiaques.

La décennie passée, nombreuses ont été les travaux consacrés à l'étude de la structure et des propriétés des gap-junctions. En générale, les maladies cardiovasculaires aussi bien aiguës et chroniques ont été associées à des changements d'expression et de remodelage des gap-junctions formés les connexines 43 (Cx43). Il a été rapporté que l'IDM affecte aussi bien l'expression, la distribution que le fonctionnement des Cx43 et sont accompagnées d'AVM.

En revanche, ces protéines ont été impliquées de façon significative dans le préconditionnement ischémique. Elles contribuent à la fois à la réduction de la taille de l'infarctus ainsi qu'à la limitation de la susceptibilité aux arythmies dans le post-infarctus (Garcia-Dorado et coll. 2002 ; Schulz et coll. 2007). Le renforcement des gap-junctions 43 fonctionnelles au niveau des cellules ischémiques apparaît alors fondamental et semble contribuer aux mécanismes de la cardioprotection.

3.2. Définition et caractéristiques

Les JCs ont d'abord été définies par microscopie électronique comme des structures permettant une communication directe entre cellules adjacentes et réduisant par conséquent l'espace extracellulaire. Des analyses structurales ont permis de définir que les JCs sont formées par la connexion de deux hémicanaux appelés connexons, pour former un pore hydrophile de 1,2 nm de diamètre (figures 7, 8). Synthétisées pratiquement par chaque type cellulaire du règne animal excepté les cellules musculaires striées adultes, les spermatozoïdes ou encore les cellules circulantes du sang (Saez et coll. 2005), ces structures protéiques ont pour rôle physiologique de synchroniser des signaux métaboliques ou électriques entre les cellules d'un tissu donné.

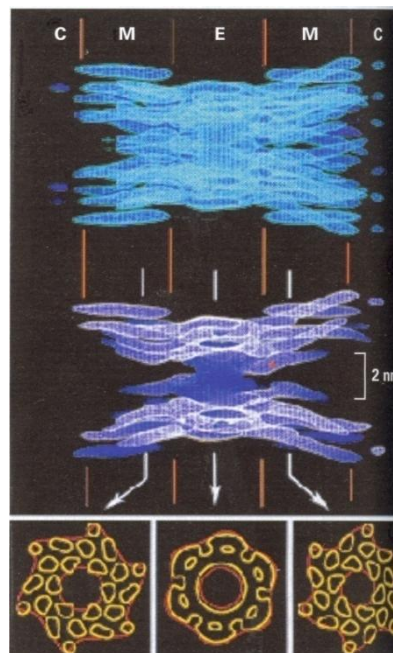


Figure 7 : Analyse structurale d'une jonction communicante.
(Biologie moléculaire de la cellule, Ed De Boeck 2005)

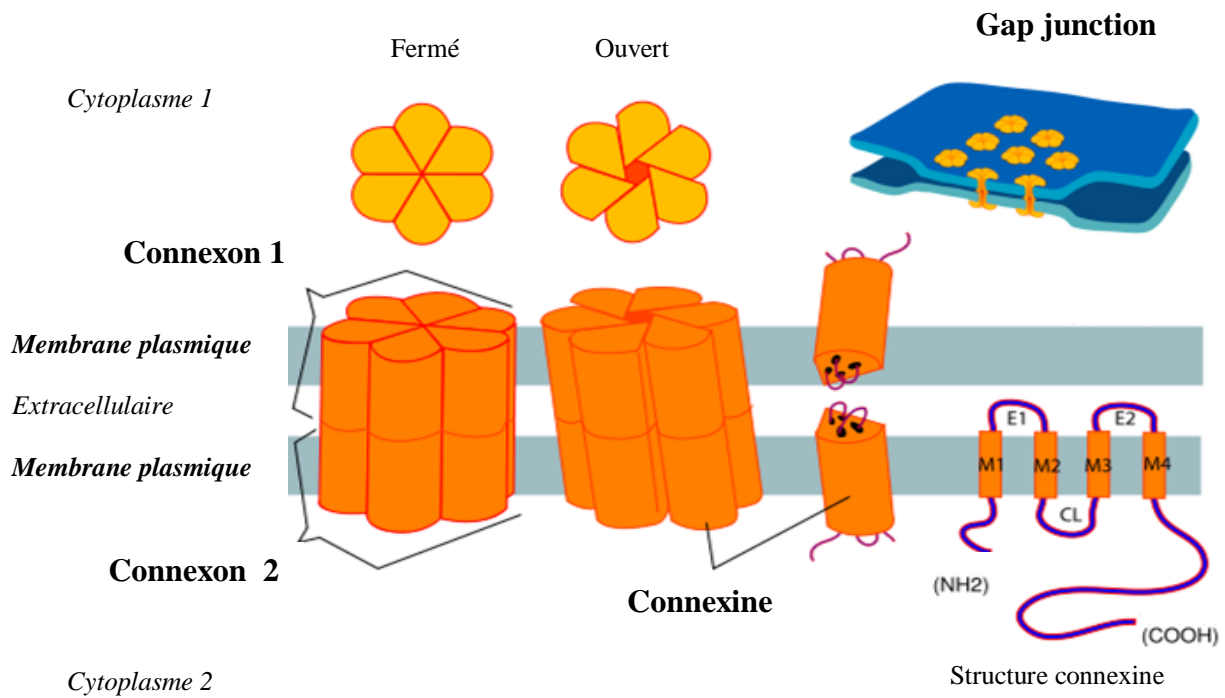


Figure 8 : Structure d'une jonction communicante.

E= domaine extracellulaire ; M= domaine transmembranaire ; CL= boucle cytoplasmique ; C= domaine cytoplasmique.

(Biologie moléculaire de la cellule, Ed De Boeck 2005)

3.2.1. Connexine (figure 8)

Isolée pour la première fois par Paul (1986), le gène de la Cx fait partie d'une superfamille de protéines intégrales membranaires d'une vingtaine de membres (Willecke et coll. 2002). Ces protéines ont préservé leur séquence et leur conformation tridimensionnelle au cours de l'évolution et présentent une structure similaire formée par une portion cytoplasmique, 4 domaines transmembranaires, 2 segments extracellulaires hautement conservés et une portion carboxyterminale de différentes longueurs expliquant les poids moléculaires des connexines qui varient entre 26 et 50 kDa. C'est au niveau de la boucle intracellulaire et de la portion carboxyterminale que des différences de séquence peuvent se retrouver. Ces portions sont supposées conférer des propriétés spécifiques aux Cx, alors que les régions conservées des Cx sont considérées importantes pour la formation et le fonctionnement des canaux jonctionnels. Certaines des régions variables pourraient, en effet, déterminer des propriétés spécifiques comme la présence des résidus phosphorylables.

3.2.2. Connexon

Avant d'atteindre la membrane cellulaire, les Cx s'assemblent par groupes de six molécules pour former des structures tubulaires creuses que sont les connexons. Ils peuvent être homomériques ou hétéromériques selon qu'ils sont formés de Cx identiques ou différentes. La co-expression de plus d'un type de Cx par cellule aboutit à la formation de connexons hétérotypiques dont les propriétés biophysiques peuvent être légèrement différentes ce qui leur permet d'assumer des rôles spécifiques (Musil et Goodenough 1993). Par ailleurs, des connexons hétérologues ont une conductance et une perméabilité moindre que celles des canaux formés par des Cx du même type. De plus, la conductance électrique et sa régulation -par la différence de potentiel- peuvent ne pas être symétriques, ce qui établit éventuellement une communication jonctionnelle préférentielle dans une direction.

3.2.3. Jonctions communicantes (pour revue, Nicholson 2003)

Lorsqu'un contact intercellulaire est établi, les connexons d'une cellule s'alignent bout à bout avec ceux de la cellule voisine, établissant un canal hydrophile continu long d'environ 10 nm. Ce canal permet le passage intercellulaire d'ions, de seconds messagers et de métabolites favorisant non seulement un couplage électrique entre les cellules mais également chimique et métabolique. En effet, les JCs permettent l'échange, entre cellules adjacentes, de petites molécules de moins de 1200 Da incluant les seconds messagers tels que l'AMPc, le glucose-6-phosphate (259 Da) ou les nucléotides (250-300 Da) et plus particulièrement facilite le passage du potentielle d'action. Dans tous les cas, le passage intercellulaire d'ions et de molécules au travers de ces canaux se fait par diffusion le long d'un gradient électrochimique.

Ce couplage jonctionnel permet donc d'équilibrer rapidement des gradients ioniques et moléculaires entre cellules voisines et de compenser aussi bien des déficits ioniques, métaboliques ou des systèmes effecteurs de certaines cellules que la distribution hétérogène de récepteurs ou d'innervation au sein d'un tissu. Ce modèle implique que le couplage jonctionnel pourrait être particulièrement avantageux dans les nombreux systèmes qui comprennent des cellules fonctionnellement hétérogènes ou fonctionnant de manière asynchrone. Via la diffusion intercellulaire de seconds messagers, le couplage jonctionnel pourrait compenser cette hétérogénéité en assurant le recrutement fonctionnel de cellules qui, autrement, n'auraient pu être activées et en coordonnant leur synchronisation.

3.2.4. Hémicanal de gap-junction (pour revue, voir Contreras et coll. 2003 Saez et coll. 2005)

Un connexon peut intégrer une membrane non-jonctionnelle et peut s'ouvrir permettant ainsi la perméabilité aux ions et petites molécules (ATP, glucose, glutathion, AMPc, prostaglandine E2, IP₃ ou encore NAD⁺). L'existence de ces hémicanaux au niveau de la membrane plasmique a été démontrée dans plusieurs types cellulaires dont le myocarde. Leur ouverture est favorisée par un certain nombre de modifications biochimiques telles qu'une faible concentration calcique dans le milieu extracellulaire, un potentiel de membrane positif, la phosphorylation de résidus critiques mais aussi un faible potentiel redox

intracellulaire (Retamal et coll. 2007). L'ouverture d'hémicanaux de Cx pourrait intervenir dans un grand nombre de fonctions biologiques telles que le maintien de l'homéostasie cellulaire (tamponnage) ou la signalisation paracrine. Elle pourrait également intervenir dans des conditions pathologiques impliquant le stress oxydant. Leur rôle est cependant mal connu.

3.2.5. Régulation de la jonction de type gap

Les gap-jonctions peuvent être modulées soit de façon immédiat par un changement rapide de leur force d'adhésion (Spray et coll. 1981 ; Nicholson 2003), ou soit à plus long terme par une modulation de leur expression au niveau de la membrane plasmique (Musil et Goodenough 1993). Leur nombre et leur activation vont dépendre du cycle cellulaire et de l'état physiologique des tissus par rapport à leur environnement. Par ailleurs, la phosphorylation des Cx par des protéines kinases, une des rares modifications post-traductionnelles applicables à ces protéines, a été impliquée dans des processus de régulation des JCs. Ces processus incluent l'assemblage des gap-jonctions, leur remodelage ou encore leur fonction de pore.

3.3. Connexine 43 dans le système cardiovasculaire

3.3.1. Tissu cardiaque (pour revue, voir Saez et coll. 2005)

Chez les mammifères, les protéines ou les ARN_m des Cx 37, 40, 43, 45 et 46 ont été isolés et identifiés dans le tissu cardiaque normal. Cependant, la distribution individuelle de ces isotopes tend à être restrictive. Par exemple, la protéine Cx37 est localisée uniquement au niveau des cellules vasculaires coronaires alors que la protéine Cx40 est exprimée dans le tissu atrial et le système de conduction proximal excepté chez le rat et le cobaye respectivement. La protéine Cx43 est la forme la plus répandue du tissu musculaire cardiaque tandis la protéine Cx45 est exprimée et distribuée de façon beaucoup plus disparate.

3.3.2. Tissu vasculaire (pour revue, voir Figueroa et coll. 2004 et Haefliger et coll. 2004)

Les informations sur l'identité et la distribution des protéines intégrales membranaire formant les JCs vasculaires sont moins précises. L'artère aorte exprime au moins 3 connexines dont la forme la plus courante et la plus abondante au niveau des cellules vasculaires est la Cx40. L'endothélium vasculaire de l'aorte exprime principalement les protéines Cx37 et Cx40 afin de former des JCs longitudinales (CE-CML) et transversales (CE-CE), alors que la Cx43 y est indétectable. En revanche, cette dernière est extrêmement abondante au niveau des régions soumises à de fortes forces de cisaillement

comme la crosse ou les bifurcations aortiques (Gabriels et Paul 1998). Elle est exprimée majoritairement au niveau des CML vasculaires, excepté au niveau des artères coronaires.

Ce couplage jonctionnel a été impliqué dans un nombre important de fonctions vasculaires comme la coordination des réponses vasomotrices, la régulation de l'angiogenèse, le renouvellement cellulaire ou encore la sénescence (Christ et coll. 1996). Il permet de coupler des cellules physiquement séparées de plusieurs millimètres et par conséquent de coupler l'ensemble du lit vasculaire concerné en coordonnant à la fois la transmission nerveuse au niveau des varicosités neuronales et les réponses cellulaires. Dans le système vasculaire, la circulation et la pression sanguine doivent en effet être régulées très rapidement par des changements précis de diamètre de la lumière vasculaire. La modulation rapide du niveau d'expression des Cx et donc de la communication intercellulaire, permet à la paroi vasculaire de faire face aux besoins tissulaires à savoir la réponse au stress mécanique, les modifications des paramètres hémodynamiques ou encore les lésions vasculaires (Yeh et coll. 1997 ; Kwak et coll. 2003).

3.3.3. Maladies cardiovasculaires (pour revue, voir Jongsma et Wilders 2000 ; Liu et Gutstein 2002)

Du fait d'une expression préférentielle pour la Cx43, des mutations de cette protéine peuvent avoir de profondes séquelles sur le phénotype et la fonction du système cardiovasculaire. En effet, ces mutations ont été impliquées dans un grand nombre d'anomalies cardiovasculaires. Par exemple, les embryons knock-out en Cx43 vasculaires présentent diverses altérations dans le développement des artères coronaires et meurent à la naissance par suite d'un blocage du flux sanguin ventriculaire droit. Par ailleurs, des anomalies dans l'expression de la Cx43 (ou gap-junction remodeling) apparaissent au cours de ces conditions pathologiques. Ce remodelage jonctionnel consiste en une baisse de l'expression de la protéine au niveau des disques intercalaires cardiaques et en une diminution globale de son niveau d'expression.

Au vu des importantes fonctions cellulaires attribuées à cette protéine, il est concevable que des altérations du couplage jonctionnel consécutives aux changements des Cx soient associées aux diverses manifestations cliniques de s maladies cardiovasculaires.

3.3.3.1. Ischémie myocardique

Chez l'homme, dans les cardiomyopathies ischémiques, le myocarde est le siège d'un remodelage jonctionnel permanent. Des changements de distribution et du nombre de gap-junctions ont été observés plus particulièrement au niveau des zones de myocarde hibernant (Kaprielian et coll. 1998) et des zones bordant l'infarctus (Smith et coll. 1991 ; Peters et coll. 1997). Les mêmes observations ont été rapportées chez l'animal (Luke et Saffitz 1991). Des altérations dans l'expression de la Cx43 ont été également observées au niveau de la zone bordante comme de la zone infarctée, zones dans lesquelles un ralentissement de la conduction cardiaque, responsable d'excitation de réentrée, a été localisé (Peters et Wit 1998). Bien que des changements de la fonction des canaux ioniques membranaires contribuent au ralentissement de la conduction cardiaque et à la vulnérabilité au phénomène de réentrée, les changements de la fonction de la JC consécutive à ces modifications y jouent un rôle déterminant durant la première heure post-ischémique (Kléber 1987). La différence en terme

de milieu biochimique et électrophysiologique existant entre le tissu ischémique, la zone bordante et la partie normalement perfusée favorise en effet la génération des AVM. Il est à souligner que ces zones sont également impliquées dans l'expansion de l'infarctus.

Considérant l'ensemble de ces données, il est concevable que les lésions ischémiques en entraînant la mort cellulaire conduisent au remodelage des JCs parallèlement au remodelage morphologique, l'ensemble constituant le substratum structural des principales caractéristiques cliniques de l'IDM incluant les troubles du rythme. Ce remodelage va entraîner la diminution du couplage de l'excitabilité myocardique et par conséquent provoque une hétérogénéité de la récupération fonctionnelle post-infarctus. La mort prématurée par FV des animaux génétiquement déficients en Cx43 au niveau du myocarde va dans ce sens.

Les situations d'ischémies sévères myocardiques ont été parallèlement associées à des modifications du niveau de phosphorylation de la Cx43. De nombreuses études ont montré que ce changement s'accompagne d'un découplage et/ou d'une baisse de la conductance des JCs, ainsi qu'au développement de phénomènes d'AVM (Janse 1991 ; Curtis et coll. 1993 ; Peters et Wit 1998 ; Schulz et coll. 2003). La régulation des JCs (assemblage/désassemblage et conductance) étant modulée par la phosphorylation des Cx, ce processus de déphosphorylation pourrait, de ce fait, être impliqué directement dans l'altération de l'excitabilité myocardique et l'apparition des troubles du rythme.

3.3.3.2. Remodelage ventriculaire (pour revue, voir Severs et coll. 2008)

Le remodelage ventriculaire post-ischémique qui concerne tous les composants de la structure et toutes les familles de protéines des myocytes, touche également les Cx avec pour principales conséquences, l'apparition de troubles du rythme. Des désorganisations focales de la distribution des JCs au niveau des zones bordantes ainsi qu'une réduction significative de l'expression ventriculaire gauche cardiaque en Cx43 (~ 50%) ont été notamment observées chez des patients en stade finale de défaillance cardiaque.

3.3.3.3. Pathologies vasculaires

La communication jonctionnelle semble également jouer un rôle essentiel dans l'initiation et la progression des modifications de la paroi vasculaire et pourrait être à l'origine de l'altération de la réactivité vasculaire.

Un remodelage de l'expression des Cx 37, 40 et 43 et plus particulièrement, une altération de l'expression de la Cx43 ont été associés à diverses pathologies vasculaires telles que l'hypertension et l'athérosclérose (Kwak et coll. 2003 ; Haefliger et coll. 2004). Elles joueraient un rôle central dans la pathogénie de ces maladies. Liao et coll. (2001) ont notamment démontré qu'une altération génique de la Cx43 vasculaire entraîne une hypotension et une bradycardie associées à une élévation marquée d'Ang I et II et à une production accrue de NO. En revanche, la surexpression de la Cx43 a été associée à la formation de plaques athérosclérotiques dans un modèle de prédisposition à l'athérosclérose (Kwak et coll. 2003). La localisation des lésions athérosclérotiques coïncide avec les zones à forte force de cisaillement et de perturbation de flux. Des études *ex-vivo* ont démontré, par ailleurs, que ces zones qui sont caractérisées par des altérations de la réactivité vasculaire dépendant de l'endothélium. L'ensemble de ces données suggèrent que le remodelage vasculaire en Cx43 est associé à une modification de la réactivité vasculaire.

De plus, Yeh et coll. (1997) ont montré une surexpression endothéliale de la Cx43 après angioplastie coronaire. L'ensemble de ces observations suggère qu'un remodelage jonctionnel peut apparaître en réponse aux lésions intimes au cours de divers processus de stress comme l'ischémie/reperfusion. Cette adaptation de la structure de la paroi vasculaire serait responsable de la modification de la réactivité vasculaire.

La Cx43 apparaît alors comme un senseur précoce des changements mécaniques qui est probablement nécessaire pour l'adaptation de l'élasticité et la contractilité des CML

De plus, les cœurs de souris chimériques en cette protéine montrent des disparités dans les propriétés électrophysiologiques du tissu cardiaque et présentent une altération majeure de la fonction systolique ventriculaire (Gutstein et coll. 2001).

3.3.4. Cx43 mitochondriale et protection cardiaque (pour revue, voir Rodriguez-Sinovas et coll. 2007)

La Cx43 est également présente au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Une baisse de son niveau d'expression est observée au cours de l'ischémie ou de l'ischémie/reperfusion myocardique alors qu'une augmentation est observée lors d'un préconditionnement ischémique ou pharmacologique. L'inactivation de cette isoforme mitochondriale supprime la protection cardiaque obtenue par les différents préconditionnement.

La Cx43 serait donc essentielle dans la protection cardiaque, notamment dans la limitation de la taille de l'infarctus suite à une ischémie et dans la survie cellulaire. Elle favoriserait la signalisation cellulaire et en particulier la signalisation médiée par les ERO au cours de cette période. Ce qui permettrait l'inhibition de l'ouverture des pores mitochondriaux à l'origine de la fuite de cytochrome c et de calcium dans le cytosol. Elle favoriserait également un découplage mitochondrial permettant ainsi une moindre production d'ERO.

3.4. Conclusion sur les jonctions communicantes

Les observations réalisées sur des animaux transgéniques et dans certaines maladies humaines suggèrent qu'une synthèse adéquate de Cx, ainsi que le couplage jonctionnel qu'elles permettent, sont fondamentaux voire vitaux pour la fonction cardiaque. Ces différentes observations suggèrent qu'une perturbation d'un de ces deux paramètres peut contribuer à la pathogénie de dysfonctionnements cardiaques importants. En altération les propriétés électrophysiologiques du tissu cardiaque, la dysfonction des gap-jonctions peut perturber la contraction cellulaire et résulter en une dysfonction mécanique. A ce jour, il est admis qu'une baisse du niveau d'expression de la Cx43 myocardique conduit à la réduction de la vitesse de conduction cardiaque responsable de la mort subite par troubles du rythme. Néanmoins, en dépit de plusieurs études intenses, les questions concernant les liens entre les modifications de l'état de phosphorylation de la Cx43 et l'IDM demeurent irrésolues. Son rôle dans l'initiation et le maintien des AVM reste incertain. Ces considérations lancent le défi d'élaborer des stratégies visant à moduler le statut de jonction de type gap fonctionnel au niveau cardiaque pour agir sélectivement sur certaines populations cellulaires telles que celles de la zone bordant l'infarctus.

4. ROLE DU STRESS OXYDANT

4.1. Le stress oxydant (pour revue, voir Kutala et coll. 2007)

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant se définit comme un déséquilibre entre la production de radicaux libres ainsi que des ERO et leur destruction par des systèmes de défenses cellulaires anti-oxydantes endogènes avec comme conséquences des altérations du fonctionnement cellulaire. A faibles concentrations, ces espèces radicalaires ou réactives sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la modulation de la croissance cellulaire (différentiation, prolifération) et des réactions inflammatoires ou encore la signalisation cellulaire (Droge 2002 ; Becker 2004). A concentrations plus élevées, elles peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire qui se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN et de protéines, la peroxydation des lipides ou encore la perturbation de l'homéostasie du calcium intracellulaire. Afin de s'en protéger, la cellule a mis en place des systèmes de défense. S'ils sont dépassés ou inefficaces, un déséquilibre se produit en faveur des radicaux libres, il y a alors stress oxydant, pathologique pour les cellules et les tissus.

4.1.1. Radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) sur une orbitale externe. Le champ magnétique créé par sa rotation, ou spin, n'est donc pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, notamment lors de réactions en chaîne dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides.

La majorité des radicaux libres rencontrés dans les milieux biologiques sont des formes dérivées de l'oxygène. En effet, de par sa structure chimique particulière, l'oxygène moléculaire, non radicalaire, est à l'origine de la formation de diverses espèces réactives telles que les radicaux libres oxygénés (l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le radical peroxyde (ROO) et le radical alkoxyde (RO) principalement) ainsi que d'autres espèces non radicalaires (l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les hydroperoxydes ($ROOH$) ou encore l'anion peroxydinitrite ($^{\cdot}OONO$) (figure 9).

L' O_2^- comme le NO figurent parmi les radicaux fréquemment formés rencontrés dans les tissus biologiques et constituent les précurseurs pouvant être activés en ERO et espèces réactives de l'azote (ERN).

4.1.2. Mécanismes pro-oxydants

Les ERO et ERN ont plusieurs origines (figure 9). Elles peuvent provenir de l'environnement comme l'exposition prolongée au soleil, à l'ozone, au tabagisme, à certains

produits chimiques (médicaments, herbicides, polluants), consommation d'alcool, de métaux toxiques (chrome, nickel ou cobalt), etc qui sont des situations génératrices de stress oxydant.

Dans l'organisme, elles sont produites au niveau des membranes, des organelles (peroxysomes, lysosomes, réticulum endoplasmique, mitochondrie) et du cytoplasme de différents types cellulaires par le biais de divers mécanismes (enzymatique et non enzymatique).

- Leur source principale de production est la **chaîne respiratoire mitochondriale**. Si cette production continue d' O_2^- reste faible et ne concerne que quelques % de l'oxygène utilisé par la respiration, elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique) ou lorsque interviennent des désordres mitochondriaux, génétiques, chimiques, inflammatoires ou nutritionnels. Au cours de l'ischémie, les cofacteurs réduits s'accumulent et au moment de la reperfusion, les électrons accumulés au niveau du pool des ubiquinones de la chaîne respiratoire peuvent être en partie transférés à l'oxygène moléculaire pour produire des O_2^- (Bauer et Bauer, 1999).

- L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux libres oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées soumises à un phénomène appelé explosion oxydative et qui consiste en l'activation du complexe de la **NADPH oxydase** capable d'utiliser de l'oxygène pour produire de grandes quantités d' O_2^- dans la membrane cellulaire. D'autres cellules comme les lymphocytes B possèdent sur leur membrane des systèmes NADPH oxydases similaires produisant des radicaux en quantité faible comme médiateurs intercellulaires. De plus, les cellules inflammatoires et immunes peuvent produire des cytokines comme le $TNF\alpha$, capables de faire produire des radicaux par la mitochondrie des cellules cibles. Une variété de stimuli pathologique tels que l'Ang II, la force de cisaillement, l'ET ou encore l'hypercholestérolémie peuvent activer la NADPH oxydase vasculaire et renforcer la production d'ERO et de ERN.

- La xanthine déshydrogénase (XDH) qui catalyse la réaction d'oxydation univalente de l'hypoxanthine en xanthine en présence de NAD^+ peut être convertie en **xanthine oxydase** (XO) lors de situations pathologiques. A la différence de la XDH, la réaction utilise l'oxygène comme accepteur d'électron, ce qui conduit à la formation d' O_2^- et de H_2O_2 (McCord, 1985).

- En présence de **myéloperoxydase**, par exemple dans les phénomènes inflammatoires, et d'ions chlore, le H_2O_2 va donner des composés chlorés très réactifs (HOCl, OCl).

- Lors de l'ischémie/reperfusion, la stimulation de la synthèse des prostaglandines au moment de la reperfusion post-ischémique est une des sources d'ERO. Une hydroperoxydase qui convertit la prostaglandine G2 en prostaglandine H2 produit de l' O_2^- et de l' 1O_2 en présence de NADH ou NADPH (Kontos et coll. 1980). Par ailleurs, l'oxydation de petites molécules réduites ou libérées au cours de l'ischémie peut entraîner la formation O_2^- , comme c'est le cas, par exemple, pour les catécholamines et les groupements thiols.

- En absence de substrat en quantité suffisante et /ou de son cofacteur, la eNOS peut générer des O_2^- par un processus dit de découplage. En retour, le $^{\cdot}OONO$ formé par le $^{\cdot}NO$ et

le $O_2^{\cdot -}$ augmente la formation de $O_2^{\cdot -}$ par le **découplage du NOS** à travers l'oxydation de l'enzyme (Zou et coll. 2002). Il est à rappeler que le NO est un important médiateur de la fonction vasculaire et est produit principalement au niveau du tissu vasculaire de façon constitutive.

En résumé, parmi les systèmes enzymatiques pouvant produire potentiellement des ERO aussi bien au niveau du tissu vasculaire, myocardique que des cellules inflammatoires, les NADPH oxydases, le système xanthine oxydoréductase, le découplage du NOS et la chaîne de transport mitochondriale (figure 10) apparaissent les plus prédominantes au cours de l'ischémie/reperfusion. Au niveau vasculaire, l'ensemble des cellules dont les macrophages, produisent des ERO dont la quantité varie en réponse des différents stimuli.

4.1.3. Mécanismes anti-oxydants

Dans les conditions physiologiques normales, la production d'ERO est généralement sous le contrôle homéostasique du système de défense endogène contre les radicaux libres afin de maintenir la balance rédox cellulaire.

4.1.3.1. Les défenses enzymatiques

Les cellules possèdent plusieurs systèmes enzymatiques (figure 10) dont la première fonction est de scavenger les ERO produits dans l'organisme. La détoxification par un processus enzymatique n'est possible que si la vitesse de réaction spontanée de l'ERO considérée est suffisamment basse. Dans ces conditions, la catalyse enzymatique permet de détourner la réaction potentielle entre l'ERO et un autre partenaire de son voisinage et ne concerne essentiellement que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes (ROOH). Il est possible d'envisager que ces systèmes enzymatiques travaillent de concert et à différent niveau afin d'établir un potentiel rédox cellulaire normal. En effet, les défenses enzymatiques peuvent protéger la cellule contre le stress oxydant à travers d'autres processus tels que la génération d'antioxydant endogène ou encore la réduction de la mort cellulaire programmée en favorisant les agents pro-apoptotiques (pour revue, voir Venardos et coll. 2007).

Les superoxydes dismutases (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD), oxydo-réductase classée sous le numéro EC : 1.15.1.1, est une métalloprotéine catalysant la dismutation du $O_2^{\cdot -}$, en eau et peroxyde d'hydrogène. Il existe quatre types de SOD selon les ions cofacteurs (cuivre et zinc ; manganèse; fer ; nickel), mais seules les deux premières formes, se retrouvent chez les eucaryotes. Dans l'enzyme à cuivre et zinc, le zinc n'a pas de rôle catalytique. On retrouve la forme à [cuivre]-zinc de la SOD (CuZn-SOD) dans le cytosol et la SOD à manganèse (Mn-SOD) dans les mitochondries de presque toutes les cellules eucaryotes.

Ce sont des enzymes antioxydantes primaires essentielles qui réagissent en défense de l'organisme contre l'anion superoxyde. Dans les mitochondries, leur rôle est de le transformer en peroxyde d'hydrogène, moins réactif, par une réaction de dismutation.

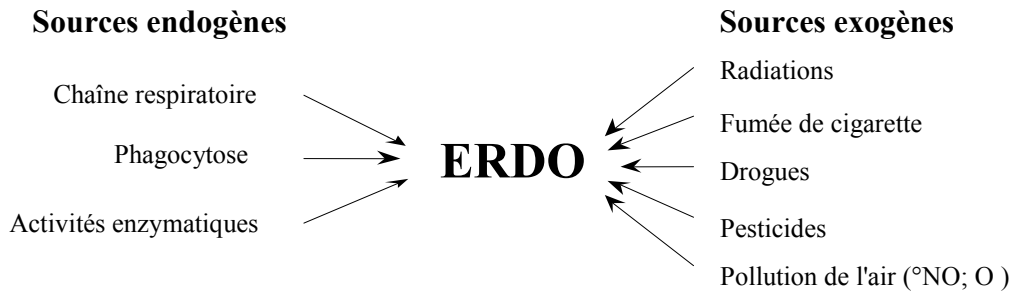


Figure 9 : Schéma des différentes sources endogènes et exogènes d'ERDO au niveau de l'organisme.

$^{\circ}\text{NO}$ = monoxyde d'azote; O_3 = ozone.

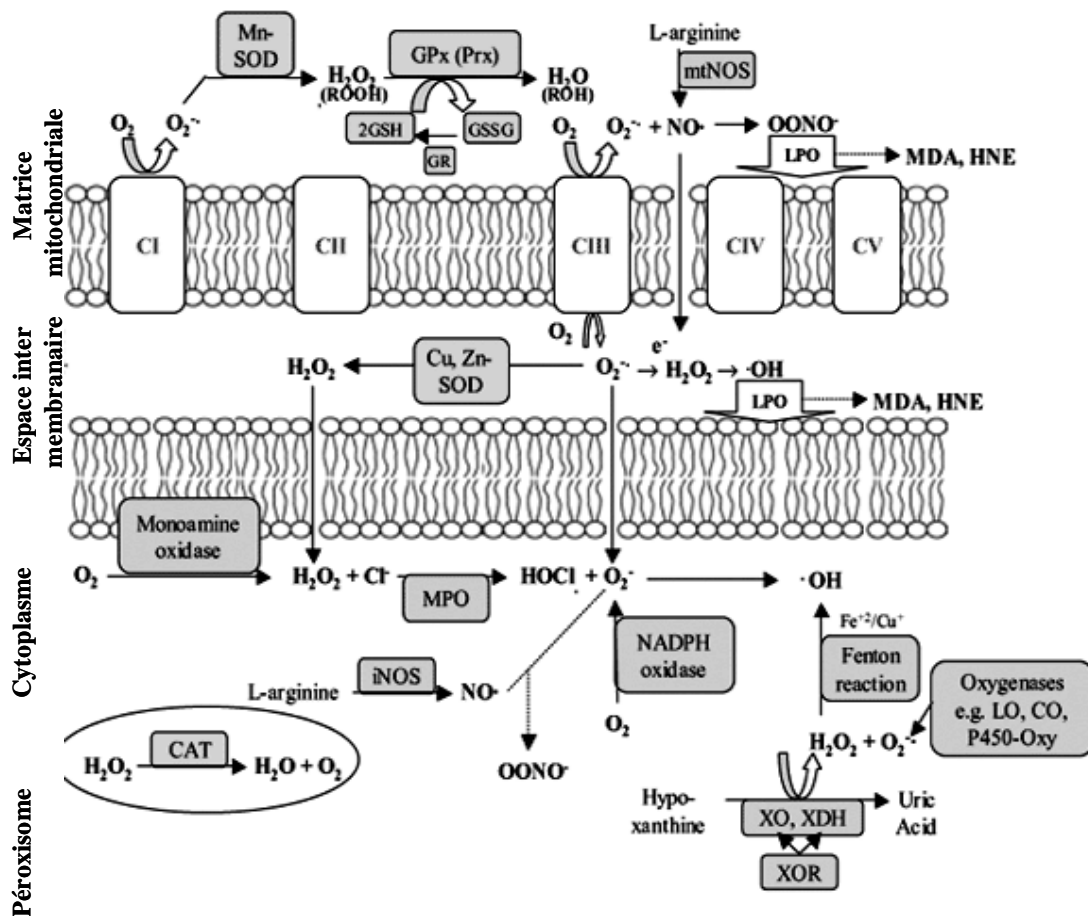


Figure 10: Voies de production d'ERO et systèmes antioxydants (non exhaustives).

CAT = catalase ; CI-V = complexes I à V de la chaîne respiratoire ; CO = cyclooxygénase ; CuZnSOD = cuivre-zinc superoxyde dismutase ; GP : glutathion peroxydase ; GSH = glutathion ; GSSG = glutathion disulfide ; GST = glutathion transférase ; iNOS = nitrique oxyde synthase inductible ; LO = lipoxygénase ; LPO = lipide peroxidation ; MDA = malonylaldéhyde ; MnSOD = manganèse superoxide dismutase ; MPO = myoélopéroxydase ; mtNOS = nitrique oxyde synthase mitochondriale ; $^{\circ}\text{NO}$ = oxyde nitrique ; P450 Oxy = cytochrome p450 oxygénase dépendant ; Prx = proxirédoxine ; ROOH = hydroxydes alkyls ; XDH = xanthine deshydrogénase ; XO = xanthine oxydase ; XOR = xanthine oxydoréductase. (www.scielo.br/)

Les catalases

Parmi les enzymes antioxydantes connues, la catalase est une des plus efficaces. Cette oxydase (numéro EC : 1.11.1.6) convertit le H₂O₂ formé au cours de la bêta-oxydation de nombreux substrats en eau et oxygène. Elle est présente particulièrement dans le foie et les globules rouges. Cependant, du fait de sa localisation essentiellement au niveau des peroxysomes, elle est peu abondante dans le myocarde. Cette compartimentation réduit considérablement ses capacités d'élimination du peroxyde d'hydrogène du cytosol et des mitochondries cardiaques. Son rôle est de prévenir la formation de radicaux hydroxyles en catalysant la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau.

Les peroxydases

Le rôle des glutathions peroxydases (GSH-Px) est très important dans la plupart des tissus où elles réalisent la quasi-totalité de l'élimination du peroxyde d'hydrogène, des peroxydes organiques au niveau du cytosol et dans l'espace extracellulaire. 4 des 5 isoformes de GSH-Px caractérisées (cytosolique, plasmatique, mitochondriale...) sont sélénium-dépendant. Ce sont des enzymes tétramériques dont chaque unité possède un atome de sélénium dans son site actif sous la forme de sélénocystéine.

La thiorédoxine réductase (TR) (McKenzie et coll.2002; Papp et coll. 2007)

La TR est une sélénoenzyme homodimérique dont le résidu C-terminal de chaque sous-unité contient une sélénocystéine, essentielle pour la fonction enzymatique. Membre de la famille des protéines pyridine disulfide nucléotidique incluant la lipoamide déshydrogénase, la mercure réductase, ou encore la glutathion réductase, la TR catalyse la réduction d'une grande variété de substrats tels que la thiorédoxine, la vitamine K, l'alloxane ou les hydroperoxydes lipidiques. Avec le NADPH (cofacteur) et la thiorédoxine (substrat), la TR forme un puissant système d'oxydoréductase, le système thiorédoxine réductase/thiorédoxine (TR/Trx). La thiorédoxine, elle-même, est un puissant antioxydant cellulaire.

En réduisant les protéines clefs de la division cellulaire, de la mort cellulaire par apoptose ou encore de la réponse au stress oxydatif, ce système intervient dans beaucoup de processus cellulaires. En particulier, il joue un rôle protecteur dans une situation de stress oxydant grâce à ses propriétés de capture directe des ERO et ERN.

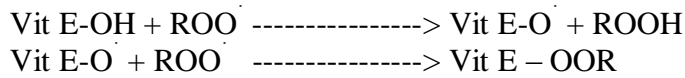
4.1.3.2. Les défenses non-enzymatiques

Il s'agit en général, de petites molécules qui présentent des propriétés de type « substrat suicide » qui peuvent être, ou non, métaboliquement réparées ou recyclées. Ces molécules opèrent comme bouclier antioxydant en devenant elles-mêmes radicalaires, et protègent les acides nucléiques, les protéines et les lipides.

Molécules liposolubles

Elles regroupent essentiellement les tocophérols ou vitamine E, les caroténoïdes et les quinones, qui sont pour la plupart, efficaces contre la propagation de la peroxydation lipidique.

- Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l'alpha-tocophérol, la forme la plus active de la classe des tocophérols, cède son hydrogène du noyau phénolique, réduisant ainsi le radical ROO, et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection.



De plus, il peut réagir avec l'oxygène, l'anion superoxyde et le radical hydroxyle.

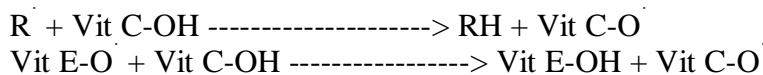
- Les caroténoïdes appartiennent pour la plupart, à la famille des polyènes conjugués. Leur principale action est de réagir avec l'oxygène singulet pour le transformer en oxygène moléculaire, mais sont capables d'intercepter les ERO produites lors de la peroxydation lipidique.

- Le Coenzyme Q10, une quinone, réagit avec les radicaux alkoxyde et peroxyde, entraînant l'arrêt de la chaîne de peroxydation lipidique.

Molécules hydrosolubles

Elles regroupent essentiellement l'acide ascorbique (vitamine C), l'acide urique, et différente protéine (fixatrices de métaux, de l'hème ou de protéines à hème).

- La vitamine C, cofacteur de nombreuses enzymes, possède également une action anti-radicalaire contre l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et principalement contre le radical tocophéryl. Les radicaux tocophéryls sont régénérés par la vitamine C. Sans cette synergie, les tocophérols seraient inactifs.



- Bien qu'initialement considéré comme un déchet du métabolisme des purines, à des concentrations physiologiques, l'acide urique présente une activité antioxydante soutenue vis-à-vis des radicaux hydrosolubles. C'est un scavenger de l'oxygène singulet, des radicaux peroxydes et du radical hydroxyle. En s'associant à ces radicaux, il entraîne la formation de composés non radicalaires.

- Les protéines de fixation des métaux (par exemple la transferrine, la lactoferrine ou la céruloplasmine) diminuent la concentration effective des métaux de transition tels que le fer ou le cuivre capables de réagir avec les hydroperoxydes (réaction de Fenton).

- Le sélénium est un constituant de la GSH-Px et de la TR parmi d'autres sélénoprotéines. Par ce biais il participe à la défense cellulaire contre les EROs (voir chapitre suivant).

4.2. Physiopathologie du stress oxydant

4.2.1. Signalisation cellulaire (pour revue, voir Dröge 2002)

Nous avons vu précédemment que durant l'ischémie myocardique ou la reperfusion post-ischémique, les ERO peuvent être produites par différentes sources incluant la mitochondrie et les réactions enzymatiques stimulées par le stress ischémique.

Il est largement admis que les ERO participent en tant que seconds messagers à la signalisation cellulaire, plus particulièrement dans la propagation des signaux pro-inflammatoires et de prolifération cellulaire. Elles sont connues pour activer la protéine p38 MAP Kinase (mitogen activated protein) et le facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B), qui sont des éléments clés de la voie de signalisation intracellulaire des macrophages conduisant à la libération de cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α . De ce fait, elles participent de façon étroite au phénomène d'apoptose et d'hypertrophie cellulaire cardiaque. Plusieurs facteurs de transcription, mais également des cascades de protéine kinases semblent être influencés par les ERO ou la situation de stress oxydant qu'elles provoquent. Le mécanisme d'action le plus probable ferait intervenir des éléments sensibles au statut rédox cellulaire tels que les résidus phosphorylables ou oxydables. Toutefois, leur présence provoque également des altérations au niveau du tissu myocardique et vasculaire.

4.2.2. Effets cytotoxiques des ERO

Les effets cytotoxiques des ERO sur les principales cibles cellulaires sont résumés par la figure 11.

4.2.2.1. Les acides nucléiques

L'attaque radicalaire sur l'ADN, qui dans 80% des cas est due à \cdot OH, a lieu au niveau des bases et/ou des sucres phosphates et conduit à divers types de dommages : cassure simple ou double brin de l'ADN, dimérisation de bases, phénomène de cross-linking, formation de sites abasiques ou perte d'un nucléotide. Ces modifications de l'ADN peuvent conduire à des mutations aboutissant à des anomalies de synthèse des protéines ou à la cancérogenèse (Cochrane 1991).

4.2.2.2. Les protéines

La toxicité des radicaux libres oxygénés vis-à-vis des acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine, histidine, méthionine, cystéine) peut entraîner des modifications structurales ou catalytiques des protéines (agrégation, fragmentation, augmentation de la sensibilité à la protéolyse). De plus, les produits de réaction des ERO sur les acides aminés peuvent être toxiques et donc aggraver les altérations. Dans les cellules cardiaques, ces dénaturations qui touchent, entre autres, les canaux membranaires et les protéines du

cytosquelette (Kako 1987), peuvent être responsables de perturbations électrophysiologiques, et donc, de l'apparition de troubles du rythme.

4.2.2.3. Les hydrates de carbone

Il a été suggéré que les radicaux libres pouvaient induire une modification de la structure des récepteurs de la surface cellulaire en agissant sur les oligosaccharides membranaires (Freeman et Crapo 1982).

4.2.2.4. Les lipides

La peroxydation lipidique d'origine radicalaire a été largement étudiée. Elle est initiée par l'attaque d'un radical libre au niveau d'une double liaison carbone-carbone sur les chaînes polyinsaturées des acides gras. Cette attaque conduit à la formation d'un radical lipidique qui réagit ensuite avec l'oxygène pour former un radical peroxy. Ce nouveau radical peut attaquer un acide gras voisin et former un hydroperoxyde et un nouveau radical alkyle. Cette réaction se propage jusqu'à ce que deux radicaux se rencontrent et forment un produit non radicalaire, tel que le malondialdéhyde ou les alcanes. Ces produits de dégradation peuvent induire des réactions cytotoxiques en se liant à l'ADN. Les hydroperoxydes eux-mêmes, très instables, se dégradent et forment des aldéhydes très réactifs tels que le 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Pryor et Porter 1990 ; Porter et coll. 1995). Ces composés sont normalement réduits en acides gras monohydroxylés par les GSH-Px, mais leur durée de vie s'accroît si ces peroxydases sont moins actives comme observé au cours de l'ischémie. Les altérations des lipides membranaires conduisent à des modifications de la perméabilité et du potentiel de membrane, à un dysfonctionnement mitochondrial, à une surcharge calcique (due aux variations des perméabilités ioniques) et à l'inactivation des enzymes membranaires par modification de leur environnement lipidique modifiant ainsi la transduction de signal correspondant.

4.3. Le stress oxydant et l'ischémie/reperfusion myocardique

La production d'ERO et les défenses antioxydantes sont en équilibre fragile dont dépend le bon fonctionnement cellulaire. L'équilibre rédox intracellulaire peut-être facilement rompu lors d'un stress oxydant comme c'est le cas lors de l'ischémie/reperfusion.

4.3.1. Le stress oxydant dans la cellule cardiaque

4.3.1.1. Lésions ischémiques

D'une manière générale, les lésions ischémiques sont les conséquences des désordres d'ordre métabolique affectant le tissu myocardique durant les premières phases de l'ischémie. Toutefois, le stress oxydant semble jouer un rôle non négligeable dans l'établissement de ces altérations. Différents auteurs ont ainsi observé la production d'ERO durant l'ischémie (Hess

et Manson 1984 ; Kevin LG 2003). Auparavant, Hill et coll. (1996) ont rapporté une baisse des défenses anti-radicalaires des cardiomyocytes dans le post-infarctus *in vivo*, résultat ayant été observés auparavant (Venardos et coll. 2007).

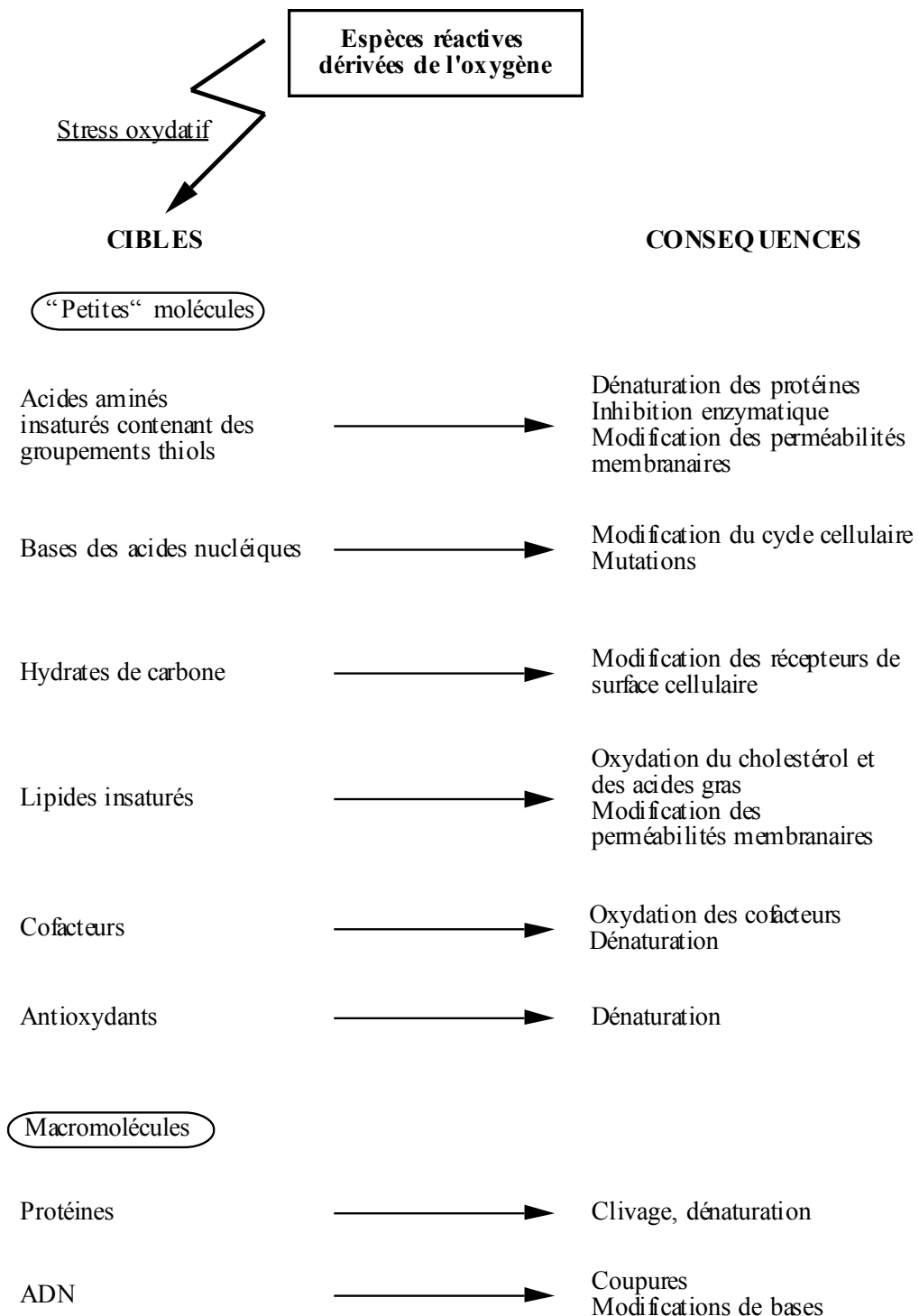


Figure 11: Principales cibles cellulaires des espèces réactives dérivées de l'oxygène.

D'après Halliwell et Gutteridge 1990.

Les effets toxiques des ERO sur les cellules cardiaques et vasculaires ont été traités en partie dans le précédent paragraphe. Comme nous l'avons souligné, ces molécules altèrent les protéines cellulaires (canaux membranaires, enzymes, protéines du cytosquelette) et les lipides membranaires impliqués dans l'environnement de ces diverses protéines. Ces phénomènes sont à l'origine de modifications électrophysiologiques dans les cardiomyocytes responsables en partie des arythmies précoces. L'ensemble des effets cytotoxiques des ERO concourt rapidement à la mort cellulaire par destruction des membranes. En effet, les modifications de la perméabilité et du potentiel de membrane, ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial consécutif aux altérations oxydatives des lipides membranaires, d'une part, la surcharge calcique, d'autre part, entraînent la rupture de la membrane et la lyse cellulaire cardiaque (nécrose).

4.3.1.2.Syndrome de reperfusion

Les ERO exercent plus facilement leurs effets cytotoxiques au moment de la reperfusion du fait de la diminution des défenses anti-radicalaires au cours de l'ischémie (pour revue, voir Venardos et coll. 2007). Si les manifestations du syndrome de reperfusion (arythmies de reperfusion, stunning et nécrose cellulaire) ont des origines multiples, il semble bien établi aujourd'hui que les ERO jouent un rôle majeur dans leur étiologie (Bolli 1991 ; Singal et coll. 1998).

Dès le début de la reperfusion, la réoxygénation entraîne une brutale production d'ERO. Le caractère concomitant de la production des ERO et de l'apparition des arythmies dites précoces suggère que les ERO joueraient un rôle dans l'initiation de ces troubles. De plus, il apparaît que les ERO peuvent induire des dépolarisations membranaires avec un délai de 5 à 10 minutes (Coetzee et coll. 1990), ce qui peut laisser supposer que les ERO pourraient jouer un rôle dans les arythmies tardives. Cette dernière observation constitue donc un argument en faveur d'un rôle des ERO non seulement dans la genèse des AR, mais également dans leur maintien au cours du temps.

La formation d'ERO est l'une de deux hypothèses pour expliquer l'apparition du stunning. Bien qu'il existe de nombreux travaux montrant clairement l'implication des ERO dans le stunning expérimental, il n'existe pas de preuve de leur formation dans le stunning chez l'homme (Ferrari et coll. 1990). Toutefois, la surcharge calcique est liée, en partie, aux dommages membranaires causés par les ERO (Coetzee et coll. 1990 ; Vandeplassche et coll. 1990).

4.3.1.3.Remodelage ventriculaire (pour revue, voir Sun et coll. 2007)

Le stress oxydant induit par l'ischémie/reperfusion affecte un grand nombre de mécanismes impliqués dans le remodelage ventriculaire post-infarctus : la dégradation de la matrice extracellulaire, la phagocytose et le chimiotactisme pour les leucocytes, la thrombomoduline en surface des CE et l'activation des fibroblastes. Il contribue de façon étroite au phénomène inflammatoire post-ischémique (voir paragraphe ERO et inflammation). Aussi, dans cette étude, nous nous sommes intéressés à cette seconde fenêtre de processus inflammatoire du post-infarctus.

4.3.2. Le stress oxydant dans le système vasculaire

Cette partie a déjà été abordée en détail dans la partie « lésions de reperfusion et réactivité vasculaire ».

Les ERO et ERN jouent un rôle de seconds messagers dans la fonction vasculaire en régulant la fonction endothéliale et la survie des cellules vasculaires. Elles contribuent à la fois, à la réponse inflammatoire et au remodelage vasculaires. Par des processus d'oxydation/réduction modifiant les caractéristiques fonctionnelles et structurales des molécules, elles modulent le phénotype des CML et influencent la prolifération, la migration et la mort des cellulaires vasculaires (Taniyama et Griendling 2003). La modification de cette signalisation rédox consécutive à une production excessive d'ERO et/ou une diminution de l'activité antioxydante lors de l'ischémie/reperfusion peuvent conduire à des altérations de la fonction vasomotrice.

Les ERO peuvent modifier directement la réactivité vasculaire par inhibition des deux agents majeurs de la vasodilatation : le NO et la prostacycline, diminuant ainsi le tonus vasculaire (Cai et Harrison 2000). La production accrue d' O_2^- entraîne une inactivation rapide du NO. Les ERO peuvent également modifier le tonus vasculaire par une action directe sur la contraction des CML. Toutefois, cet effet est non uniforme à cause de la diversité des ERO. Le peroxyde d'hydrogène, considéré comme une ERO, entraîne une relaxation vasculaire alors que les autres ERO induisent le contraire. Par ailleurs, la surproduction d'ERO mène à une réponse inflammatoire aiguë qui est caractérisée par une plus grande adhérence des neutrophiles aux CE entretenant le phénomène oxydatif, et est accompagnée d'une diminution de la relaxation NO dépendante. L'utilisation de divers piègeurs d'ERO, qui est capable de prévenir les lésions de reperfusion par une limitation de l'adhérence et/ou l'activation des neutrophiles, augmente la disponibilité biologique du NO.

5. SÉLÉNIUM

5.1. Introduction

Les oligo-éléments constituent une classe de nutriments dont la définition ne repose ni sur des propriétés chimiques, ni sur des propriétés biologiques homogènes. Ils sont présents à une teneur inférieure à 1 mg/kg de poids corporel. Essentiels à l'organisme pour de très faibles concentrations, ces éléments-traces se définissent comme des éléments dont la carence ou l'excès en apport se traduisent par des troubles fonctionnels et dont un apport à doses physiologiques prévient ou guérit ces troubles. Le sélénium, dont le rôle en physiopathologie humaine a été clairement établi de par sa capacité à prévenir la maladie de Keshan (Luo et coll. 1985), est considéré, depuis plus d'une décennie, comme un élément trace essentiel à risque de carence démontré chez l'homme.

Les effets biologiques du sélénium est directement lié à son intégration dans différentes protéines sous la forme d'un cofacteur ou d'un acide aminé. Ainsi, le plus souvent, le sélénium se retrouve associé au site catalytique des enzymes sous sa forme sélénocystéine

où il participe directement aux cycles d'oxydo-réduction, comme dans le cas de la GSH-Px ou de la TR.

Cet élément trace a un effet antioxydant capital dans la détoxification des ERO produits par le métabolisme cellulaire. Cet antioxydant serait responsable des effets anti-vieillessement et protecteur cardiaque attribués au sélénium. Il est capable de réguler l'état rédox cellulaire et en liant les métaux lourds tels que l'arsenic, le cadmium, le mercure, le plomb, l'argent etc est à même de modifier leur toxicité. Dans le cas du cadmium, le sélénium s'est révélé efficace dans la limitation des effets toxiques, tant en terme de mortalité que de cardiotoxicité ou de tératogénicité (Prince et coll. 2007).

5.2. Sources et statut en sélénium

Dans l'écorce terrestre, le sélénium se trouve à un taux moyen de 0,2µg/g. Toutefois, sa répartition dans les sols est extrêmement variable depuis les zones pauvres dites sélénoprives (<0,1µg/g) jusqu'aux zones trop riches dites sélénifères (peut atteindre plus de 1 200µg/g). A partir du sol, l'élément peut-être extrait par les plantes qui le transforment en composés organiques, telle la sélénométhionine. L'apport du sélénium chez l'homme et chez les animaux vient principalement de la nourriture, puis de l'eau. Ainsi, la disparité des teneurs en sélénium dans le sol se répercute sur sa teneur dans les végétaux qui peut varier de 0,1 à 10 000 µg/g et par conséquent sur la concentration en cet élément chez l'homme. Habituellement, celui-ci est évalué par la concentration sanguine en cet élément, qui est sensible à l'apport quotidien et donc un bon indice de statut (pour revue, voir Maggee et James 1996).

Le sélénium existe sous différentes formes chimiques. Dans la nature, on trouve l'élément principalement sous forme de séléniures, alors que les formes alimentaires se trouvent exclusivement sous forme de composés organiques et inorganiques et en général inclus dans des protéines animales ou végétales (sélénométhionine, sélélocystéine, S-méthylsélélocystéine, sélélocystéine...) (Simonoff 1990). Si la forme organique (exemple : sélénométhionine) semble moins toxique que les formes inorganiques (exemple : sélénite), elle favorise, cependant, une incorporation non spécifique du sélénium en remplacement de la méthionine dans les protéines (Buk et Hill 1993). Elle peut réduire alors l'efficacité d'une supplémentation en sélénium.

5.3. Physiologie et physiopathologie

5.3.1. Séléloprotéines (pour revue, voir Papp et coll. 2007)

Le sélénium est un élément qui joue multiple rôles physiologiques du fait de son implication dans le fonctionnement de diverses protéines, les séléloprotéines. Sur le plan fonctionnel, seuls quelques séléloprotéines parmi les 25 identifiées ont été à ce jour caractérisées. La plupart exhibe une activité enzymatique et semble jouer un rôle dans la régulation du statut rédox cellulaire. C'est notamment le cas de la séléloprotéine W, de la

sélenoprotéine de la capsule mitochondriale et de la iodothyronine déiodinase de type I. La sélenoprotéine W, dont le rôle reste encore incertain, est exprimée majoritairement dans le muscle et serait impliquée dans la protection de celui-ci contre un certain nombre de processus provoquant la myopathie en cas de carence en sélénium et vitamine E. D'autres sélenoprotéines apparaissent directement impliquées dans l'élimination des ERO. C'est le cas de la sélenoprotéine P, initialement mise en évidence dans le plasma, des GSH-Px et de la TR. La sélenoprotéine P représente la forme majeure du sélénium plasmatique (~65%) et est une protéine à multiples résidus séléncystéines dont la fonction serait associée au transport de sélénium d'une part et à la protection des CE vasculaires d'autre part. La GSH-Px représente la forme la plus riche en sélénium avec 25 % du sélénium total. Les différents rôles des GSH-Px et des TR ont été traités dans le paragraphe « Défenses enzymatiques ».

L'expression des divers sélenoprotéines est régulée par l'apport en sélénium avec un ordre hiérarchique d'expression (Behne et coll. 1988 ; Burk et Hill 1993). Ainsi, les pathologies humaines associées à un déficit en sélénium peuvent être attribuées à une augmentation du stress oxydant et une altération de la signalisation rédox cellulaire.

5.3.1.1. Glutathion peroxydase

Ce sont les premières sélenoprotéines à avoir été découvertes. Elles sont connues pour catalyser la réduction des peroxydes d'hydrogène et d'hydroperoxydes organiques protégeant ainsi les cellules contre les attaques oxydatives. Chez l'homme, 9 GSH-Px ont été identifiées, seulement 5 sont dépendantes du sélénium. Les membres de cette famille incluent : une forme cytosolique (GSH-Px1) qui est ubiquitaire, une forme spécifique exprimée au niveau de l'intestin (GSH-Px2), une forme plasmatique (GSH-Px3) qui agit particulièrement sur les lipides oxydés, une glutathion peroxydase phospholipidique (GSH-Px4), une forme exprimée spécifiquement au niveau des spermatozoïdes (snGSH-Px4) et une forme exprimée par les tissus embryonnaires et localisée au niveau de l'épithélium olfactif (GSH-Px6).

5.3.1.2. Thiorédoxine réductase

Les membres de cette famille sont des protéines homodimériques, chaque monomère incluant un groupement prosthétique FAD, un site de liaison à la NADPH, et deux sites actifs, un formé par un groupement disulfide et un autre constitué par un résidu séléncystéine. Elle catalyse la réduction de la forme oxydée de la thiorédoxine qui, entre autre, active la thiorédoxine peroxydase, capable de réduire le peroxyde d'hydrogène.

L'isoforme mitochondriale (TR2) fournit une défense spécifique contre les ERO produits par la chaîne respiratoire, maintenant ainsi la balance rédox cellulaire, critique pour la survie cellulaire. L'isoforme cytosolique (TR1) quant à elle, est associée plus particulièrement dans la régénération de protéines inactivées par le stress oxydant dont la vitamine C et la NOS (McKenzie et coll. 2002).

Elle contrôle également le statut rédox cellulaire. De plus, elle permet la régénération de l'acide déhydroascorbique en acide ascorbique.

Dès lors, le sélénium est impliqué dans les défenses cellulaires naturelles des membranes et des organites intracellulaires contre les divers hydroperoxydes, phospholipides et peroxy-nitrites produits dans certaines situations physiopathologiques. Il intervient dans la régulation de la signalisation cellulaire dépendant du statut rédox. Dans cette optique, les

effets de carence et de supplémentation en cet élément ont été étudiés dans différents modèles animaux (Koller et Exon 1986 ; Coudray et coll. 1996 ; Toufektsian et coll. 2000).

5.3.2. Carence

Les apports nutritionnels journaliers en sélénium nécessaires dans l'espèce humaine sont estimés à 50-70 µg/jour (Rayman 2000).

Chez l'homme, les cas de carence sévère en sélénium n'apparaissent qu'en réponse à des apports vraiment très faibles (<20 µg/jour). La manifestation la plus caractéristique de cette situation de carence est la maladie de Keshan. Initialement décrite dans une population chinoise dont l'apport journalier en sélénium était extrêmement bas (Luo et coll. 1985 ; Xia et coll. 1992 ; Blot et coll. 1993), celle-ci est caractérisée par le développement de foyers de nécrose cardiaque. Il a été démontré que la mortalité due à la maladie de Keshan était directement corrélée au statut en sélénium des patients (Hensurd et coll. 1994) dont la carence affecte l'occurrence et la virulence des infections virales de la Coxsackie.

Parallèlement à ce syndrome, des études cliniques ont montré que certaines des complications observées chez des patients en nutrition parentérale, pouvaient être liées à une carence en sélénium (pour revue, voir Marcus 1993). Dans les deux cas, une supplémentation en sélénium réduit ces troubles cardiaques (Levy et coll. 1994 ; Rannem et coll. 1995).

Si les carences sévères semblent extrêmement rares et essentiellement limitées au syndrome de Keshan et à la nutrition parentérale, les cas de carences mineures ou de sub-carences, correspondant à des apports de 20 à 40 µg/jour, semblent plus fréquents chez l'homme. En effet, l'apport en sélénium est considéré comme très bas dans la plupart des pays industrialisés (Rayman 2000). Diverses manifestations physiopathologiques (hypertension, athérosclérose) peuvent apparaître dans ces situations de carences modérées. Et plusieurs études cliniques et épidémiologiques ont montré les effets délétères d'un apport insuffisant en sélénium sur les fonctions cardiovasculaires (pour revue, voir Rayman 2000 ; Flores-Matéo et coll. 2006). Si la corrélation entre le statut en sélénium et les maladies cardiovasculaires est sujet à controverse, une meta-analyse récente effectuée sur 25 études de cas contrôle et prospectives, a démontré un lien entre le statut tissulaire en Se et le devenir de coronaropathies (Flores-Matéo et coll. 2006) (tableau 2). En particulier, une augmentation de 50 % de la concentration en sélénium diminue de 24 % les risques d'événements coronariens. Toutefois, le rôle protecteur du sélénium dans les maladies coronaires cardiaques reste difficilement à établir puisque peu des études randomisées ont testé l'effet de la supplémentation en sélénium sur des critères cliniques et la plupart des études étaient en combinaison avec d'autres molécules antioxydantes.

5.3.3. Surcharge

Si les cas de carence sont bien documentés, il n'existe que peu d'informations en ce qui concerne la surcharge en sélénium. Chez l'homme, la concentration en sélénium est considérée comme toxique au-delà de 300 µg/jour (Rayman 2000). Une exposition chronique à de fortes teneurs en cet élément a été observée dans plusieurs populations de régions de

monde sélénifères telles que les plaines du Nord américain, une partie du Venezuela et de la Colombie ainsi qu'une région de la Chine (Yang et coll. 1983 ; Combs et Combs 1986). Cependant, aucun effet toxique n'a été observé hormis des cas d'intoxication accidentelle suite à une ingestion ou une inhalation (Maggee and James 1996). Les effets toxiques ou sélénose incluent la perte de la chevelure et des ongles, des lésions de la peau, le développement d'une cirrhose hépatique et des désordres du système nerveux. Les mêmes signes de toxicité ont été observés chez les animaux intoxiqués chroniquement par le biais de plantes poussant dans les régions sélénifères (Combs et Combs 1986). Quelques auteurs ont par ailleurs suggéré qu'un apport très élevé en sélénium pouvait favoriser le développement de différents cancers (Oldfield 1987).

Chez le rat, l'administration d'un régime enrichi en sélénium (environ 2,5 mg/kg) sur une période de 8 à 10 semaines ne semble pas exercer d'effet toxique marqué (Coudray et coll. 1996 ; Pucheu 1994). Des régimes contenant 1,5 mg Se/kg correspondent donc à un apport élevé en sélénium, mais qui reste dans la partie haute de la fourchette des valeurs physiologiques.

5.4. Ischémie/reperfusion

Les données concernant l'implication du stress ischémique sur la teneur en sélénium sont insuffisantes. Il a été rapporté que l'ischémie ou l'ischémie/reperfusion entraîne une altération du statut corporel en sélénium. Pucheu et coll. (1994) ont mis en évidence une baisse du sélénium plasmatique -utilisé usuellement pour définir le statut en cet élément- pendant la phase aigüe du post-infarctus avec ou sans traitement par angioplastie coronaire des patients ayant eu un IDM. Des résultats semblables ont été également obtenus par Lafont et coll. (1996) qui ont montré que le taux de sélénium sanguin diminue significativement après angioplastie coronaire. La déplétion en sélénium entraîne une baisse à la fois de la teneur en GSH-Px et de son activité (Takahashi et coll. 1986). Encore récemment, les études de la bioactivité du sélénium se sont focalisées sur l'activité de cette enzyme. Hill et Singal (1997) ont démontré que l'activité enzymatique du GSH-Px du myocarde diminue progressivement dans le post-infarctus. L'explication avancée est que l'ischémie ou l'ischémie/reperfusion, en engendrant un stress oxydant mobilise les défenses antioxydantes et entraîne un effondrement du pool tissulaire en sélénium.

D'un côté, un apport insuffisant en sélénium a été associé à l'augmentation de la vulnérabilité à l'ischémie ou à une séquence d'ischémie/reperfusion du tissu cardiaque dans différents modèles animaux (Toufektsian et coll. 2000 ; Tanguy et coll. 1998 ; Venardos et coll. 2004). De l'autre, la supplémentation en cet élément dans les limites des doses recommandées réduit significativement les manifestations du syndrome de reperfusion (Poltronieri et coll. 1992 ; Tanguy et coll. 1998 ; 2004 ; Venardos et coll. 2004).

Eu égard à l'ensemble des observations, le statut en sélénium apparaît donc comme un facteur déterminant dans l'apparition et le pronostic de diverses maladies cardiovasculaires. Cependant, il est difficile de préciser si les maladies cardiovasculaires, en l'occurrence l'IDM, sont à l'origine de la carence en sélénium ou inversement. Considérant la dualité de la question, il nous incombe de s'intéresser à chacune des voies : la supplémentation en sélénium et l'évolution du taux plasmatique en sélénium dans le post-infarctus chez le rat.

5.5. Inflammation

D'autres situations de stress oxydant et d'inflammation ont été associées au statut en sélénium. Une baisse de la séléniémie (>40%) est observée chez des patients en sepsis (Forceville et coll. 1998). En plus de ses effets antioxydants, le sélénium exhibe des propriétés anti-inflammatoires (Rayman 2000). La supplémentation à forte dose en sélénium dans le syndrome de réponse inflammatoire systémique semble bénéfique sur la mortalité avec une adéquation avec les marqueurs de l'inflammation (Angstwurm et coll. 2007).

Plusieurs médiateurs pro-inflammatoires en stimulant la production endothéliale vasculaire de chémoattractants augmentent l'expression de molécules d'adhésion et initient l'inflammation tissulaire. (Malik et Lo 1996). La déficience en sélénium semble augmenter l'expression de ces molécules d'adhésion et favoriser l'adhérence des neutrophiles au niveau des CE artérielles (Maddox et coll. 1999). De plus, la peroxydation lipidique en altérant la fluidité membranaire, modifie la synthèse des eicosanoïdes favorisant l'élaboration de médiateurs pro-inflammatoires (Hampel et coll. 1989 ; Neve 1991). Par ailleurs, plusieurs des auteurs ont démontré une altération de la biosynthèse cellulaire des eicosanoïdes lorsque les cellules sont mises en situation de carence en sélénium (Maddox et coll. 1991 ; Cao et coll. 1992). L'ensemble de ces données permet de suggérer qu'au cours d'une situation de stress oxydant, une déficience en sélénium pourrait avoir des effets dévastateurs. Notamment, au cours d'une ischémie/reperfusion myocardique, la déficience en sélénium pourrait exagérer et maintenir le processus inflammatoire initié durant la phase précoce du post-infarctus favorisant ainsi le remodelage pathologique du ventricule droit.

Dans ce cas, un apport nutritionnel en sélénium durant un processus pathologique impliquant à la fois le stress oxydant et l'inflammation, pourrait être bénéfique.

5.6. Conclusion sur le sélénium

Les FV qui apparaissent au cours de l'ischémie et/ou de la reperfusion mènent à la mort subite ou mort inattendue qui représente 20% de la mortalité des maladies cardiovasculaires. Si le sélénium diminue les troubles du rythme, le statut en cet élément peut constituer un facteur de risque nouveau et important notamment en France dont plus de 10 % de la population présente une déficience séléniée. Il convient d'élargir la compréhension du lien entre le statut en sélénium et les cardiopathies qui représentent encore une des premières causes de mortalité en France et dans les pays industrialisés.

Méthode générale

1. ANIMAUX

L'ensemble de ce travail a été réalisé sur des rats mâles de souche WISTAR (Harlan France SARL, Gannat). Le poids corporel et la nourriture des animaux utilisés sont variables selon le protocole expérimental et seront spécifiés dans le paragraphe Méthodes de chacun des chapitres suivants.

Dans tous les cas, les animaux ont été placés dans des conditions de température et d'humidité constante avec un cycle jour/nuit standard (12h/12h) et ont eu un libre accès à l'eau et à la nourriture. Les animaux ont eu une période d'adaptation à leur environnement (nourriture, animalerie) d'au moins 7 jours avant leur utilisation et ont reçu des soins conformes aux directives de l'Union Européenne sur l'utilisation des animaux de laboratoire (L358-86/609/EEC). Certificat d'autorisation d'expérimentation sur animaux vivant.

2. MODELES EXPERIMENTAUX

2.1. Modèle de cœur isolé perfusé par voie aortique

2.1.1. Principe de la perfusion aortique

Les cœurs ont été perfusés par voie aortique selon une technique adaptée au rat et dérivée de celle mise au point par Langendorff (1895). Une fois prélevé, le cœur de l'animal est suspendu par l'aorte à une canule de perfusion métallique à travers laquelle arrive le liquide de perfusion. Dans ces conditions, les valvules aortiques ou sigmoïdes restent fermées sous l'effet de la pression du liquide dans l'aorte. Le liquide de perfusion passe alors dans le réseau coronaire et perfuse de façon continue le myocarde. Les effluents coronaïres se déversent dans le sinus coronaire, à l'intérieur de l'oreillette droite. Une petite incision au niveau de l'artère pulmonaire permet de favoriser l'écoulement du liquide de perfusion vers l'extérieur de l'organe.

Il existe deux types de perfusion par voie aortique :

- la perfusion à débit constant, dans laquelle une pompe péristaltique permet d'imposer une valeur de débit coronaire déterminée par l'expérimentateur ;
- la perfusion à pression constante, dans laquelle ce sont les résistances vasculaires qui déterminent le débit de perfusion en fonction de la hauteur de la perfusion.

NB : Pour l'ensemble de nos manipulations sur cœur isolé, seul le dispositif de perfusion à pression constante a été utilisé.

2.1.2. Composition du liquide de perfusion

Le liquide de perfusion dont la composition figure ci-dessous (en mM) est filtré sur filtre Millipore de 0,8 micromètres de diamètre de pores (Millipore corporation, Billerica, MA, USA) avant utilisation:

NaCl	: 118,50
NaHCO ₃	: 25,00
KCl	: 4,75
MgSO ₄ , 7H ₂ O	: 1,19
KH ₂ PO ₄	: 1,18
CaCl ₂ , 2H ₂ O	: 1,36
Glucose	: 11,10

Le milieu est thermostaté à $+37,0 \pm 0,2$ °C et saturé par un mélange gazeux de type carbogène (O₂ : 95%- CO₂ : 5 %) afin de maintenir le pH à une valeur de 7,4.

2.1.3. Préparation du cœur

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg/kg de poids corporel), administré par injection intra-péritonéale, puis sont héparinés (100 UI d'héparinate de sodium/rat) par la veine saphène. Cette injection d'héparine, réalisée une minute avant l'ouverture du thorax, permet d'éviter la formation de caillots sanguins dans le réseau coronaire. Le cœur de l'animal est ensuite prélevé, puis plongé immédiatement dans du liquide physiologique à +4°C afin de préserver son statut énergétique. Cette immersion conduit en effet à un arrêt rapide de la fonction contractile cardiaque. Le cœur est alors monté rapidement sur l'appareil de perfusion aortique, puis perfusé à pression hydrostatique constante (100 cm d'eau, soit 9,81 kPa) à l'aide d'une solution physiologique de composition analogue à celle décrite par Krebs et Henseleit (1932). Pendant toute la durée de l'expérimentation, le cœur est placé dans une chambre thermostatée à $+37,0 \pm 0,2$ °C pour éviter une baisse de la température tissulaire. Dans tous les cas, le montage du cœur sur le dispositif de perfusion est réalisé en moins de 3 minutes.

2.1.4. Protocole d'ischémie/reperfusion myocardique

Sur ce dispositif de cœur isolé perfusé, il est possible de réaliser différents types d'ischémie :

- ischémie globale totale (IG) : l'arrivée du liquide de perfusion au cœur est stoppée, la circulation coronaire est donc totalement abolie et l'ischémie affecte de façon homogène l'ensemble de la masse myocardique ;

- ischémie globale à débit réduit : l'ischémie affecte là aussi la totalité du cœur, mais un débit résiduel faible choisi par l'expérimentateur est maintenu à l'aide d'une pompe péristaltique ;

- ischémie régionale (IR): un fil de ligature (fil de soie 5/0, United States Surgical, Tyco Healthcare Group) relié à une aiguille courbe (section triangulaire 3/8) est passé sous l'artère coronaire gauche (ACG) à un point proche de son origine (1-2 mm en aval de la naissance de l'artère septale). Un nœud est serré sur un cathéter de polyéthylène de diamètre : 0,5 mm (PE-50). La zone alimentée par l'ACG est alors rendue ischémique, tandis que le reste du myocarde est normalement perfusé.

Dans tous les cas, la reperfusion correspond à la restauration des conditions initiales (pré-ischémiques) de perfusion. Dans le cas de l'IR, la reperfusion de la zone ischémique est réalisée en coupant le fil sur le cathéter.

2.1.5. Evaluations des variables fonctionnelles

Sur un tel dispositif de perfusion, le cœur effectue un travail mécanique externe pratiquement nul (2% de la valeur normale) car les ventricules restent vides. Pour imposer à la préparation un travail quantifiable, un petit ballonnet de plastique non compliant est introduit dans le ventricule gauche via la valve mitrale (Curtis et coll., 1986). Il est relié à un capteur de pression (Statham P23XL, Hugo Sachs Elektronik, Hungstetten, Germany) et à un enregistreur (Gould Recorder 2200, Gould Instrument System Inc, Valley View ; USA). Le ballonnet est ensuite rempli d'eau de façon à imposer une pression diastolique minimale de $+4,0 \pm 0,5$ mmHg.

Le volume est maintenu constant durant toute l'expérience afin de permettre la mesure des variations de pression intraventriculaire. Le cœur effectue ainsi un travail externe mesurable à partir du tracé de pression. Cependant, ce travail est différent de celui effectué par l'organe dans les conditions physiologiques normales. Les contractions (isovolumiques) de la paroi du ventricule gauche contre le ballonnet se font sans qu'il y ait de modification du volume de la cavité. Dans ces conditions, on parle de **cœur pseudo-travaillant**.

Le dispositif expérimental permet d'avoir accès à différentes variables représentatives de la fonction cardiaque :

- le débit coronaire (DC), mesuré par prélèvements réguliers des effluents coronaires à la sortie de la chambre thermostatée, est exprimé en millilitres par minute (mL/min) ;
- la fréquence cardiaque (FC), enregistrée par l'intermédiaire du capteur de pression, est exprimée en battements par minute (bts/min) ;
- les pressions systolique (PSys) et diastolique (PDst) ventriculaires gauches, enregistrées par l'intermédiaire du capteur de pression, sont exprimées en millimètres de mercure (mmHg). De ces deux variables est déduite la pression développée (PDev= PSys - PDst) exprimée en mmHg ;
- les dérivées premières maximales positive (+dP/dt) et négative (-dP/dt) du tracé de pression, qui constituent un indice des cinétiques de contraction et de relaxation du cœur sont exprimées en millimètres de mercure par seconde (mmHg/s).

Dans le cas d'un protocole d'ischémie globale, les variables suivantes sont mesurées additionnellement (figure 14):

- l'amplitude maximale de la contracture ischémique (CM), exprimée en mmHg ;
- le délai d'apparition de la contracture (DAC) qui correspond à la durée d'ischémie au bout de laquelle la pression diastolique a doublé, exprimé en min ;

- le délai de mise en contracture maximale (DMC) qui correspond au temps mis pour atteindre l'amplitude maximale de la contracture, exprimé en min.

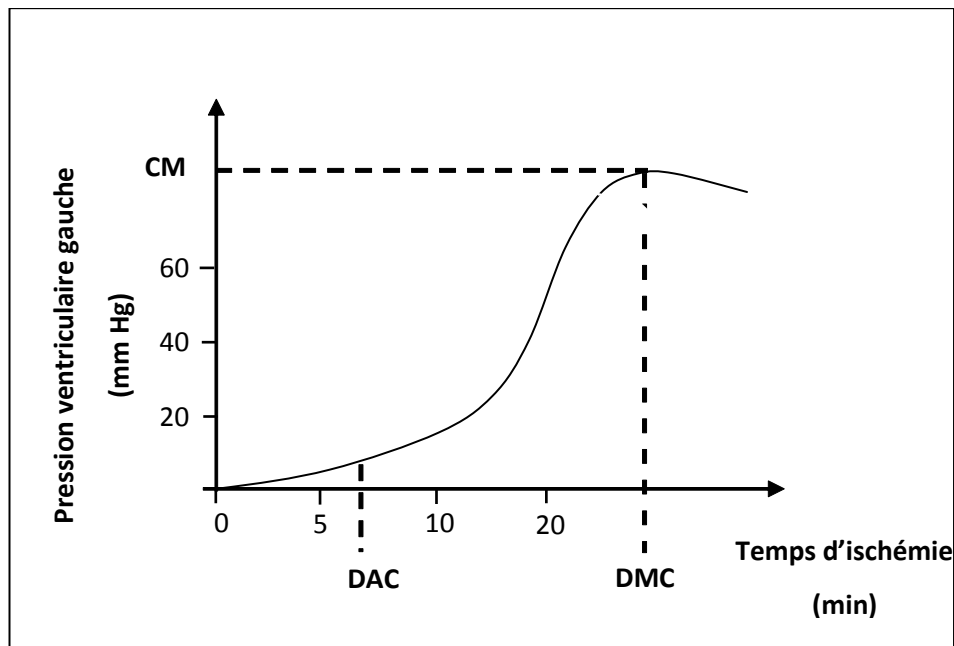


Figure 12 : Paramètres hémodynamiques caractérisant la contracture ischémique

DAC = délai d'apparition de la contracture ; DMC = délai mis pour une contracture maximale ; CM= Contracture maximale.

2.1.6. Protocole d'étude des arythmies de reperfusion

Afin d'évaluer les arythmies au cours de l'ischémie, un électrogramme est enregistré par l'intermédiaire de 2 électrodes (déviation D2) reliées à l'enregistreur (Gould Recorder 2200). La première électrode est plantée dans la pointe du cœur et la seconde électrode (électrode de référence) est reliée à la canule aortique. Ce type de dispositif ne permet pas d'analyser de façon précise les différents complexes de l'électrocardiogramme, mais donne accès à la fréquence cardiaque et permet d'évaluer la présence de troubles du rythme.

Les différents types d'arythmies sont définis en accord avec les conventions LAMBETH (Walker et coll, 1988) :

- extrasystoles (ES);
- tachycardies ventriculaires (TV): succession d'au moins 4 extrasystoles ;
- fibrillation ventriculaire réversible (FVR): période durant laquelle les complexes QRS ne sont plus distinguables les uns des autres ;
- fibrillation ventriculaire irréversible (FVI) : dans notre protocole d'ischémie *in vivo*, une fibrillation est définie comme irréversible si après 5 secondes de fibrillation le cœur n'a

pas retrouvé spontanément son rythme sinusal. Lorsqu'une période de fibrillation dépasse 5 secondes, le cœur est stimulé électriquement et de façon transitoire, par l'intermédiaire d'une paire d'électrodes épocardiques reliées à un stimulateur (Harvard 6002) pour permettre le retour au rythme sinusal. La première électrode est placée à la base de l'oreillette droite et la deuxième au niveau de la canule aortique.

Pour comparer la sévérité des troubles du rythme des différents animaux, chaque cœur est défini par un score (Curtis et Walker, 1988) qui caractérise le type d'arythmie le plus sévère présenté par la préparation lors de la reperfusion post-ischémique:

- Score 0 : absence de troubles du rythme à la reperfusion;
- Score 1 : présence d'extrasystole(s) uniquement ;
- Score 2 : période de tachycardies ventriculaire sans ES ;
- Score 3 : période de fibrillation ventriculaire réversible avec ou sans TV;
- Score 4 : période de fibrillation ventriculaire irréversible.

La moyenne des scores est calculée pour chaque groupe expérimental.

2.2. Modèle *in vivo* d'induction de l'infarctus du myocarde

2.2.1. Généralités

Le modèle d'infarctus expérimental utilisé est celui de l'IR temporaire induite *in vivo* chez le rat par ligature de l'ACG. Cette technique, décrite par Selye et coll. (1960) et modifiée par Moro et coll. (2007), présente l'avantage d'être à l'origine du développement rapide d'un infarctus du myocarde transmural, dont la taille ($\geq 40\%$ du ventricule gauche) est suffisante pour l'étude des dysfonctionnements précoces de la fonction cardiaque. De plus, cette technique est très reproductible (Zamanis et coll., 1982) et facilement quantifiable par des méthodes histoenzymologiques *post-mortem*.

2.2.2. Protocole chirurgical

Les animaux sont anesthésiés par injection intra-musculaire d'un mélange kétamine-xylazine aux doses respectives de 50 mg/kg et 10 mg/kg. Les rats sont ensuite intubés et ventilés à l'aide d'un respirateur Apelex (fréquence : 60/min ; volume : 1 mL/100g de poids corporel) avec un mélange gazeux (80,0% air ; 19,5 % oxygène ; 0,5 % isoflurane). L'infusion en continu d'isoflurane permet de maintenir l'anesthésie de l'animal durant toute la procédure chirurgicale. La température corporelle de l'animal est maintenue à $37,0 \pm 0,2$ °C par l'intermédiaire d'une couverture chauffante reliée par une sonde rectale à un système de régulation (Homeothermic Blanket System, Harvard Apparatus ; USA).

Une incision cutanée est pratiquée à gauche du sternum et les muscles pectoraux sont écartés, donnant accès à la cage thoracique. Une thoracotomie est ensuite réalisée par ouverture du quatrième espace intercostal. Le péricarde est perforé, puis le cœur est extériorisé par pression des deux index de part et d'autre de la cage thoracique. Suite à un

léger pivotement du cœur vers la partie antérieure droite de l'animal, on peut accéder à l'ACG, repérable grâce à la présence d'une veine superficielle qui la borde.

Un fil de soie 5/0 de section triangulaire 3/8 et de longueur 11 mm (United States Surgical, Tyco Healthcare Group) est passé sous l'ACG à hauteur de la pointe de l'oreillette gauche, en aval de la bifurcation septale de l'artère. Le cœur est ensuite réintégré dans la cage thoracique. Un cathéter en polyéthylène est passé autour des fils de ligature et enfoncé délicatement dans la cavité.

2.2.3. Protocole d'ischémie/reperfusion myocardique *in-vivo*

A l'issue d'une période de stabilisation de 10 minutes après la préparation de l'animal, l'ACG de l'animal est ligaturée en tirant sur les deux extrémités du fil de ligature à travers le cathéter et en les maintenant en tension avec un clamp placé juste au-dessus du cathéter. Après une période d'ischémie d'une durée d'une heure, la reperfusion est assurée en détachant le clamp et en enlevant le cathéter. Les poumons sont alors légèrement surgonflés et les muscles pectoraux rabattus afin de recréer le vide pleural. Après la fermeture de la cage thoracique, du chlorhydrate d'atipamezole (1,7 mg/kg, i.m.) est injecté afin d'accélérer le réveil de l'animal.

Les rats « Sham » subissent la même procédure chirurgicale, mais le fil de ligature n'est pas serré.

2.2.4. Evaluation de la fonction cardiaque *in-vivo* et surcharge volumique

8 jours après la chirurgie, les rats ligaturés (IM) et les rats opérés à blancs (Sham) sont réanesthésiés par injection intra-musculaire d'un mélange kétamine-xylazine aux doses respectives de 50 mg/kg et 10 mg/kg. La température corporelle de l'animal est maintenue à $+37,0 \pm 0,2$ °C comme précédemment. Après intubation, le rat est aussitôt ventilé artificiellement (fréquence : 60/min, volume : 1 mL/100g de poids corporel) et hépariné par voie intraveineuse (125 UI/mL/kg) avec de l'héparinate de sodium.

Un cathéter (PE-10) est placé au niveau de la veine fémorale droite afin de réaliser une surcharge volumique par perfusion d'une solution de NaCl (9 ‰) thermostatée à 37°C. Un autre cathéter (PE-30) relié à un capteur de pression (Statham P23XL, Hugo Sachs Elektronik, Hungtetten, Allemagne) est placé dans la carotide gauche pour permettre de mesurer la pression artérielle systémique de l'animal. Un troisième cathéter (PE-30), relié à un second capteur de pression, est placé dans la carotide droite, puis avancé jusque dans la cavité gauche du cœur afin de suivre l'évolution de la pression ventriculaire gauche. Les capteurs de pression sont reliés à un préamplificateur et à un dispositif informatique d'acquisition (PowerLab 2/20, AD Instruments, Australia ; Apple Computer iMAC DV ; logiciel CHART 4.0.4).

Après une période de 15 minutes de stabilisation post-instrumentation, les paramètres hémodynamiques sont mesurés. Les valeurs obtenues sont représentatives de la fonction cardiaque à l'état basal (avant surcharge volumique).

Une surcharge volumique est ensuite réalisée par perfusion de solution physiologique (NaCl 9‰) à 37°C à un débit de 17mL/min/kg pendant 1 minute, *via* le cathéter placé au niveau de la veine fémorale. Les données hémodynamiques enregistrées à ce stade sont représentatives de la fonction cardiaque en conditions de surcharge (en fin de surcharge volumique).

Les paramètres hémodynamiques mesurés sont : la pression artérielle systémique moyenne (PA) en mmHg ; les pressions ventriculaires gauches en fin de diastole (PDst) et de systole (PSys) en mmHg ; la pression développée (PDev) en mmHg ; les dérivées première positive et négative de la pression ventriculaire gauche ($\pm dP/dt$) en mmHg/sec, ainsi que la fréquence cardiaque (FC).

2.2.5. Evaluation de la compliance passive ventriculaire gauche *ex vivo*

A la fin de l'étude fonctionnelle, le cœur est arrêté en diastole par perfusion intraveineuse d'une solution saturée en chlorure de potassium. Le cœur est ensuite prélevé, monté sur une canule de perfusion par voie aortique et rincé avec une solution physiologique (NaCl 9‰). Un cathéter relié à une cellule de pression (Statham P23XL, Hugo Sachs Elektronik, Hungstetten, Allemagne) est ensuite introduit dans le ventricule gauche afin de permettre le suivi de la pression intraventriculaire gauche. Les jonctions auriculo-ventriculaires droite et gauche, ainsi que les veines caves et l'artère pulmonaire, sont ligaturées pour que la cavité ventriculaire soit parfaitement isolée et étanche. Après élimination de l'air et du liquide dans le ventricule gauche (pression ventriculaire gauche autour de -5 mmHg), du sérum physiologique est perfusé dans le ventricule gauche à débit constant (0,68 mL/min). L'augmentation de pression intracavitaire en fonction du volume perfusé est suivie jusqu'à ce que la pression atteigne la valeur de 30 mmHg.

A partir de chaque courbe pression-volume, 3 constantes de rigidité k sont déterminées selon la portion de courbe considérée (Figure 15). La courbe pression-volume est assimilée à une droite pour les pressions de 0,0 à 2,5mmHg et la constante k_1 est calculée sur cette portion de courbe selon l'équation $P = k_1V + a$. A partir de 2,5mmHg, la pression intracavitaire gauche augmente de façon exponentielle et les constantes de rigidité k_2 et k_3 sont calculées respectivement pour des pressions entre 2,5 et 10,0 mmHg et 15,0 et 30,0 mmHg à partir de l'équation $P = b.e^{kV}$. Dans ces équations, P correspond à la pression, V au volume et a et c sont des constantes.

Le volume mort (VM) ou volume de la cavité est mesuré lorsque la pression intracavitaire gauche est encore nulle et juste avant qu'elle ne commence à s'élever.

Le volume résiduel télédiastolique (VDst) est déterminé à partir de la courbe pression-volume moyenne obtenue *in vitro*, et de la valeur de la PDst moyenne obtenue *in vivo* à l'état basal.

NB= A l'issue de cette étude, les cœurs ont été rapidement congelés, puis conservés à -80° pour les études ultérieures.

2.2.6. Estimation de la géométrie cardiaque sur coupes transversales et mesure de la taille d'infarctus

L'analyse de la géométrie cardiaque a été réalisée sur une coupe (épaisseur : 20 μ m) transversale médiane de chaque cœur (à environ 5,5 mm de l'apex) selon la technique décrite par Sulpice et coll. (1996). La surface de la cavité ventriculaire gauche (SCVG), la surface totale du ventricule gauche (cavité + paroi + septum) (STVG) et les périmètres épi et endocardiques de la masse ventriculaire gauche ainsi que les périmètres épi- et endocardiques de la nécrose sont mesurées par planimétrie à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image NIH 1.62 (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Pour chaque cœur, le rapport SCVG / STVG est déterminé par l'indice de dilatation des cavités (ID). Les épaisseurs moyennes de la paroi libre du ventricule droit (EVD), du septum (EMS) ainsi que l'épaisseur minimale de la paroi libre du ventricule gauche (EVG) sont mesurées. L'indice de rétrécissement de la paroi infarctée (IRP) est déterminé par le rapport entre l'épaisseur minimale de la paroi infarctée et l'épaisseur moyenne du septum. L'indice d'expansion (IE) de l'infarctus est exprimé par le rapport des deux indices précédents : indice de dilatation ID / indice de rétrécissement IR. La représentation schématique du calcul de ces différents paramètres géométriques est décrite sur la figure 3.

Enfin, les tailles d'infarctus des cœurs ayant subi une ligature de l'ACG ont été calculées. La taille d'infarctus (zone ischémique ou ZI) est définie par le rapport de la somme des périmètres épi et endocardiques de la nécrose sur la somme des périmètres épi et endocardiques de la masse ventriculaire gauche. La taille d'infarctus globale est exprimée en pourcentage du ventricule gauche (figure 16).

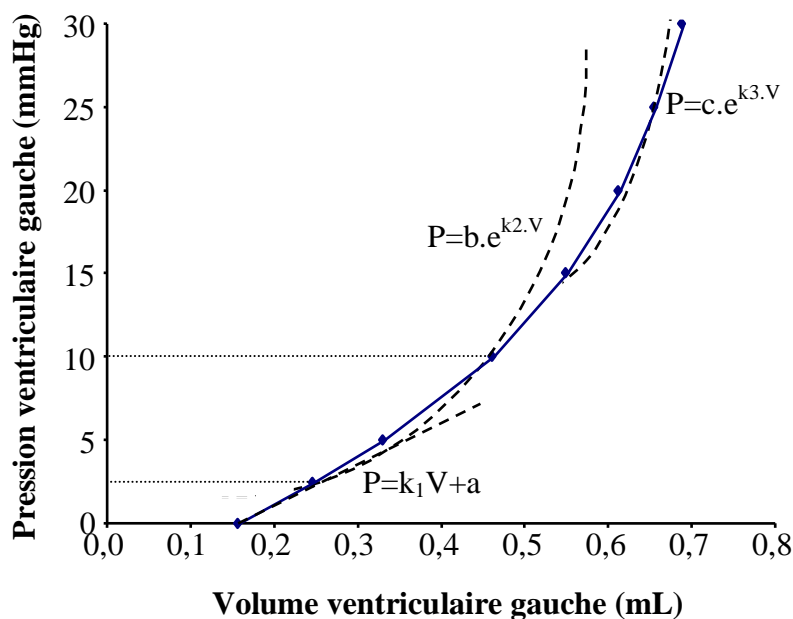


Figure 13 : Détermination des constantes de rigidité k à partir des courbes pression-volume.

k_1 : constante de rigidité calculée pour des pressions ventriculaires allant de 0 à 2,5mmHg ; portion de la courbe assimilée à une droite

k_2 : constante de rigidité calculée pour des pressions ventriculaires allant de 2,5 à 10mmHg ; portion de la courbe assimilée à une exponentielle

k_3 : constante de rigidité calculée pour des pressions ventriculaires allant de 15 à 30mmHg ; portion de la courbe assimilée à une exponentielle

a, b, c : constantes

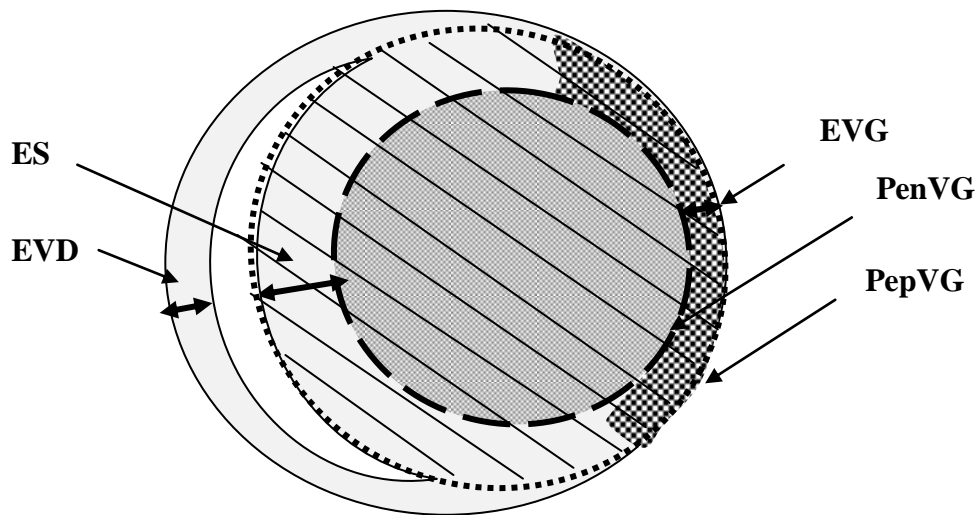


Figure 14 : Représentation schématique de l'analyse de la géométrie cardiaque sur une coupe transversale d'un cœur de rat après ligature de l'artère coronaire gauche suivie de reperfusion.

■ SCVG = surface de la cavité ventriculaire gauche ; ■ ZI = zone infarctée ;
 □ Zone normoperfusée ; ▨ STCG = surface totale de la cavité ventriculaire gauche ;
 EVD= épaisseur minimal du ventricule droit ; EVG= épaisseur minimal du ventricule gauche ; ES= épaisseur du septum ; - - - PenVG = périmètre de la cavité du ventricule gauche ; PepVG = périmètre épicaudique du ventricule gauche.

$$\begin{aligned}
 & \text{Indice de dilatation (ID)} : \frac{\text{SCVG}}{\text{STVG}} \\
 \text{Indice d'expansion (IE)} = & \frac{\text{SCVG}}{\text{STVG}} \\
 & \text{Indice de rétrécissement (IRP)} : \frac{\text{EVG}}{\text{ES}}
 \end{aligned}$$

$$\text{Taille Infarctus} = \frac{\text{Périmètre Epi} + \text{Périmètre Endocardique de la Nécrose}}{\text{Périmètre Epi} + \text{Périmètre Endocardique de la Masse Ventriculaire Gauche}}$$

3. DOSAGES BIOCHIMIQUES

3.1. Conservation des échantillons

3.1.1. Conservation des échantillons tissulaires

A la fin du protocole de perfusion sur cœur isolé, les oreillettes sont séparées de la masse ventriculaire. Dans le cas des protocoles incluant une IG, l'ensemble de la masse ventriculaire est rapidement congelée à la température de l'azote liquide à l'aide d'une pince de Wollenberger (1960), tandis que dans les protocoles d'IR, la paroi du ventricule gauche est séparée du reste du myocarde (septum et paroi libre du ventricule droit) et les deux fragments sont congelés séparément. Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les dosages.

Dans le cadre du protocole d'induction d'infarctus du myocarde *in-vivo*, la ZI a été séparée de la masse ventriculaire. La zone normoperfusée (ZN) a été conservée à -80° pour les dosages biochimiques.

3.1.2. Conservation des échantillons plasmatiques

Les échantillons de sang prélevés au niveau de l'artère caudale de l'animal anesthésié sont récupérés dans des tubes sur un lit d'héparinate de sodium. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à +4°C et à 2000 g. Le plasma est alors récupéré, puis réparti en différentes aliquotes congelées dans l'azote liquide et conservées à - 80°C.

3.1.3. Préparation des homogénats tissulaires

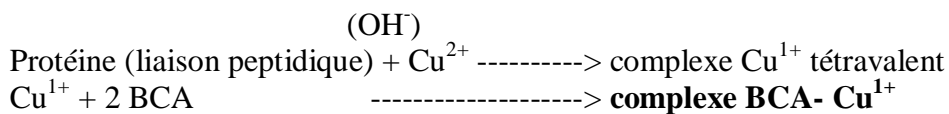
Pour le dosage d'activité enzymatique, les échantillons sont homogénéisés dans un tampon Tris-HCl (50 mM, pH = 7,4) contenant 1 mM d'acide diéthylènetriaminepenta-acétique (DTPA; chélateur de métaux) et 1mM de phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF; inhibiteur des protéases) à raison de 9 mL de tampon pour 1 g de tissu. Les homogénats sont réalisés à 4°C avec un homogénéisateur à la vitesse de 400 tours / min, durant deux périodes de 1 minute séparées par 30 secondes de repos dans la glace.

L'homogénat obtenu est ensuite soniqué à +4°C pendant deux fois 30 secondes. Il est alors centrifugé à 2 000 g pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Une aliquote du surnageant est prélevée pour le dosage des oligoéléments et des protéines totales. Le reste du surnageant est centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes afin de séparer les mitochondries de la fraction cytosolique. Différentes aliquotes du surnageant sont prélevées et conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les différents dosages réalisés.

Pour l'analyse par Western Immunoblotting, les échantillons sont préparés selon le protocole décrit dans le chapitre correspondant.

3.2. Dosage des protéines

La concentration protéique de chaque échantillon tissulaire et plasmatique a été déterminée selon la méthode de Bradford en utilisant le kit BCA-200 Protein Assay, Pierce, Rockford. La méthode BCA est fondée sur la réduction du Cu^{2+} en Cu^{1+} par les protéines et la réaction du Cu^{1+} avec 2 molécules d'acide bicinchonique (BCA). Le complexe coloré BCA- Cu^{1+} absorbe fortement à 562 nm.



Avant utilisation, les échantillons (plasmatiques et tissulaires cardiaques) sont dilués au 1/20^{ème} dans du NaCl 9 ‰. La concentration en protéine des échantillons a été déterminée à partir d'une droite d'absorbance à 562 nm en fonction de la concentration d'une gamme standard de protéines (sérum albumine bovine ou BSA) allant de 0,0 à 2,0 mg/mL.

3.3. Dosage d'activité enzymatique (Tableau 1)

3.3.1. Activité superoxyde dismutase

3.3.1.1. Principe

Le dosage de l'activité SOD est réalisé selon la méthode de Marklund et coll. (1976). Elle repose sur l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzène, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$), un générateur de $\text{O}_2^{\cdot -}$, par la SOD. Le pyrogallol étant un petit phénol absorbant à 410-420 nm, la réaction est suivie pendant 5 minutes à une longueur d'onde 410 nm.

3.3.1.2. Protocole

- Auto-oxydation du pyrogallol : prise d'essai

Avant le dosage de l'activité SOD dans les échantillons cardiaques, le volume de pyrogallol à utiliser est déterminé en mélangeant environ 1,05 mL du tampon de dosage et environ 50 μL de solution de pyrogallol, afin d'obtenir une variation de DO par minute ($\Delta\text{DO}/\text{min}$) = $0,020 \pm 0,001$ à 410 nm.

- Activité SOD :

L'activité SOD présente dans les échantillons cardiaques est dosée en incubant 1048 µL de tampon de dosage, 45 µL d'échantillon (les échantillons mitochondriaux ne sont pas dilués, les échantillons cytosoliques sont dilués au 1/10^{ème}) et le volume de pyrogallol prédéfini dans une cuve de spectrophotomètre.

Les différents composants (voir ci-dessus) sont mélangés, puis l'évolution de la DO est suivie pendant 5 minutes à 410 nm, à température ambiante, après 30 secondes d'incubation.

3.3.1.3. Expression des résultats

De pH 7,9 à 9,1 et en présence d'EDTA, la réaction est inhibée à 90 % par la SOD. Une unité d'enzyme est définie comme la quantité d'enzyme capable d'inhiber la vitesse d'auto-oxydation du pyrogallol de 50% dans les conditions du dosage. La vitesse est maximum sans SOD.

La variation de la DO moyenne par minute est alors déterminée. Les paramètres suivants sont ensuite calculés:

- pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol (PI) :

$$PI (\%) = \frac{(DO_{moyenne\ blanc} - DO_{moyenne\ échantillon})}{DO_{moyenne\ blanc} \times 100}$$

- activité de SOD totale :

$$SOD_{totale} (U/ml) = \frac{(PI \times V)}{(v \times 50)}$$

100 et 50: 100 et 50 % d'activité SOD

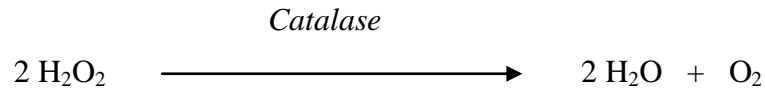
PI : pourcentage d'inhibition

V : volume de la cuve (µL)

v : volume de la prise d'essai ou volume de l'échantillon (µL)

3.3.2. Activité catalase**3.3.2.1. Principe**

Le dosage de l'activité catalase est réalisé selon la méthode de Beers et Sizer (1952). La réaction est fondée sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase. L'activité catalasique des échantillons tissulaires cardiaques est alors déterminée en suivant la décroissance de l'absorption du H₂O₂ à 240 nm pendant 1 minute suivant la réaction :



3.3.2.2. Protocole

Les homogénats de cœur sont dilués deux fois dans du tampon de dosage.

La cuve "témoin" contient 600 à 650 μL du tampon de dosage + 300 μL de la solution de H_2O_2 diluée de façon à obtenir une $\text{DO} = 0,500 \pm 0,005$.

Les cuves "échantillon" contiennent 600 à 650 μL du tampon de dosage + 300 μL de la solution de peroxyde d'hydrogène diluée au $1/200^{\text{ème}}$ + 20 à 50 μL d'échantillon dilué: le volume de la prise d'essai est choisi pour avoir une variation de DO comprise entre 0,03 et 0,1.

Après cinq secondes d'incubation, l'évolution de la DO est suivie pendant 1 minute à 240 nm et la variation de DO par minute est déterminée.

3.3.2.3. Expression des résultats

Les résultats sont tout d'abord exprimés en mU/mL d'échantillon. Ils sont ensuite exprimés par gramme de protéines présentées dans l'échantillon en tenant compte de la dilution effectuée avant le dosage.

$$\text{U CAT} / \text{ml} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min} \times \text{V}}{0,0436 \times v}$$

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: variation de densité optique par minute

V: volume réactionnel (mL)

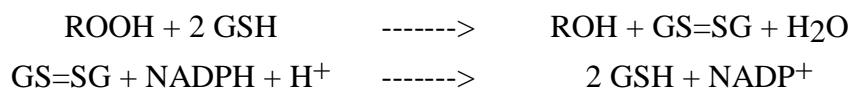
v: volume de la prise d'essai (mL)

0,0436: coefficient d'extinction millimolaire du H_2O_2 ($\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$)

3.3.3. **Activité glutathion peroxydase**

3.3.3.1. Principe

Le dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px) est réalisé selon la méthode de Flohe et Gunzler (1984). La réaction est fondée sur la réduction des hydroperoxydes organiques en alcools par la GSH-Px, parallèlement à l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG est ensuite réduit par la glutathion réductase (GR) en présence de NADPH. L'activité GSH-Px dans les échantillons est déterminée en suivant la décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm.



NB= L'hydroperoxyde utilisé est le tert-butylhydroperoxyde (t-BHP).

3.3.3.2. Protocole

Avant utilisation, les échantillons plasmatiques sont dilués au 1/5^{ème} tandis que les homogénats de cœur au 1/4 dans le tampon phosphate.

La cuve "témoin" contient 900 µL du tampon de dosage + 50 µL du tampon phosphate + 50 µL de la solution de t-BHP.

Les cuves "échantillon" contiennent 900 µl du tampon de dosage + 50 µL d'échantillon dilué + 50 µL de la solution de t-BHP.

Après une minute d'incubation, l'évolution de la DO est suivie pendant 3 minutes à 340 nm et la variation de DO est déterminée.

3.3.3.3. Expression des résultats

Les résultats sont tout d'abord exprimés en mU/mL d'échantillon. Les résultats obtenus sont ensuite exprimés par gramme de protéines présent dans l'échantillon en tenant compte de la dilution effectuée avant le dosage.

$$\text{mU GPx / mL} = \frac{(\Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{échantillon}} - \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{blanc}}) \times V}{6,22 \times v} \times 2 \times 1000$$

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: variation d'absorbance par minute sur les trois minutes de mesure

V: volume réactionnel (mL)

v: volume de la prise d'essai (mL)

6,22: coefficient d'extinction millimolaire du NADPH ($\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$)

2: facteur tenant compte des 2 GSH produits pour chaque NADPH oxydé

1000: facteur pour convertir en mU

3.3.4. Activité Thioredoxine réductase

3.3.4.1. Principe

Le dosage de la thioredoxine réductase (TR) est réalisé selon une méthode dérivant de celle d'Ellman Riddles (Arner et coll. 1999). Ce dosage est fondé sur la réduction du réactif d'Ellman, le DTNB (5,5'-dithio-bis (2-dinitrobenzoïque acid)) en présence du NADPH en acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB), un produit coloré jaune (kit Thioredoxin Reductase Assay n° 10007892, Cayman Chemical; Ann Arbor). L'activité de l'enzyme est déterminée en suivant l'augmentation de l'absorption du TNB à 405 nm ou à 414 nm et à 22°C.

Plusieurs enzymes peuvent réduire le DTNB en TNB à savoir la glutathion réductase et la glutathion peroxidase. Aussi, l'activité propre de TR est obtenue en faisant la différence entre l'activité enzymatique en absence et en présence d'inhibiteur spécifique de la TR, l'aurothiomalate de sodium (ATM).



3.3.4.2. Protocole

Avant utilisation, les échantillons plasmatiques ainsi que les homogénats de cœur sont dilués au 1/4 dans du tampon de dosage.

La cuve "témoin" contient 160 μL du tampon de dosage ;

Les cuves "échantillon" contiennent 140 μL du tampon de dosage + 20 μL d'échantillon dilué ;

Les cuves "inhibiteur" contiennent 120 μL du tampon de dosage + 20 μL d'échantillon dilué + 20 μL d'ATM.

Un mélange à volume égal de 20 μL de la solution de NADPH et de la solution de DTNB initie la réaction. La variation de la DO est suivie pendant 7 minutes à 414 nm.

3.3.4.3. Expression des résultats

La vitesse de réaction (VR) est déterminée selon la formule suivante et exprimée en $\Delta\text{DO}/\text{min}$:

$$\text{VR} = \Delta\text{DO}/\text{min}_{\text{échantillon}} - [\Delta\text{DO}/\text{min}_{(\text{échantillon} + \text{ATM})} - \Delta\text{DO}/\text{min}_{(\text{blanc} + \text{ATM})}]$$

Les résultats sont ensuite exprimés en micromoles par litre et par minute :

$$\text{Activité TR } (\mu\text{M}/\text{min}) = \frac{\text{VR}}{6,75} \times \frac{0,2}{0,02} \times \text{D}$$

6,75 : coefficient d'extinction du DTNB à 414 nm;

0,2 : volume réactionnel en mL ;

0,02 : volume de l'échantillon en mL ;

D : facteur de dilution de l'échantillon.

4. WESTERN IMMUNOBLOTTING (détection de la Cx43)

4.1. Préparation des homogénats tissulaires

50 mg de tissu ont été homogénéisés avec un tampon contenant des inhibiteurs de protéases et, plus particulièrement, de protéases à tyrosine, ainsi que des inhibiteurs de phosphatases et de donneurs de phosphate : NaOV 1 μM ; NaF 10mM ; β -glycérophosphate 20mM ; Leupeptine 0,4 μM ; Pepstatine 0,29 μM ; Aprotinine 0,29 μM ; EGTA 1mM ; EDTA 1 mM ; E-64 5.10⁻¹ μM et PMSF 1mM. Ces inhibiteurs ont été choisis et mélangés de façon à rendre impossibles les échanges de phosphates entre les protéines et à bloquer leur déphosphorylation.

Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 10 000g à 4°C. Les échantillons ainsi obtenus sont ensuite fractionnés en différentes aliquotes en vue des différents dosages puis conservé à -80°C.

Les échantillons sont dilués dans du tampon d'échantillon de telle sorte que le volume de dépôt (20 μL /puits) contienne 20 μg de protéines. Du β -mercaptoéthanol (5% final) et 1 μL

de bleu de bromophénol (repérage du front de migration) sont ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons ainsi préparés sont portés à ébullition pendant 5 minutes avant leur utilisation afin de linéariser les protéines.

4.2. Electrophorèse et transfert de protéines sur membrane

Les différentes étapes (électrophorèse + transfert de protéines) du protocole de Western Immunoblotting (WI) ont été effectuées en utilisant le système « Mini-Protean® III » de Bio-Rad Laboratories.

Les échantillons préparés à partir des homogénats de coeurs sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) de 1 mm d'épaisseur afin de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. 20 µg de protéines de chaque homogénat tissulaire sont déposées dans les puits de gel (4 % gel de concentration, 10% gel de séparation). Pour chaque gel, un échantillon de marqueurs colorés de poids moléculaires (Gibco, France) est déposé en parallèle des échantillons. La migration des protéines se fait sous une tension de 100V pendant environ 45 minutes dans une cuve à électrophorèse.

Celles-ci sont ensuite transférées (environ 1 h sous un courant de 350mA) puis immobilisées sur membranes de polyvinylidène difluoride (PVDF).

Les sites non spécifiques des membranes sont saturés avec des protéines de lait (TBS-Tween20 0,05% + Lait demi-écrémé 10%) pendant 60 minutes sous agitation et à température ambiante (blocage). Après lavage (TBS- Tween20 0,05% + Lait demi-écrémé 1%), les membranes sont ensuite incubées avec des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la connexine 43 (Cx43), notre protéine cible, pendant une heure à température ambiante et sous agitation. L'anticorps primaire (CX1B1; Zymed Laboratories, Inc ; USA) est dilué au 1/1500^{ème} et reconnaît spécifiquement la forme déphosphorylée au niveau du résidu sérine 386 de la Cx43 migrant à 41 Kda. L'anticorps primaire (35800; Zymed Laboratories, Inc ; USA) dilué au 1/750^{ème} reconnaît spécifiquement toutes les formes de la Cx43 migrant entre 45 et 41 Kda. Puis, les membranes sont rincées 4 fois durant 7 minutes avec du TBS-T contenant 0,5% de lait demi-écrémé. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire (1/2000^{ème}) spécifique des immunoglobulines de l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase (UP446330 ; Uptima, Interchim, Montluçon, France). Les substrats de cette dernière composé de peroxyde stable et de luminol (Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrat, Pierce, Rockford) sont mis en présence des membranes et la chemiluminescence produite est détectée par autoradiographie (révélation).

4.3. Analyse des films d'autoradiographie et expression des résultats

Les films d'autoradiographie (CL-Xposure™ Film, Pierce, Rockford, USA) ont été scannés sur un dispositif informatique et convertis au format TIFF. La quantification de

l'intensité des bandes a été réalisée à l'aide du logiciel d'imagerie NIH (National Institutes of Health). La densité des bandes est exprimée en unités arbitraires.

5. STATISTIQUES

Les résultats présentés dans ce rapport sont exprimés sous la forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (sem). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse StatView 5.0. Les variances des groupes expérimentaux ont été soumises à un test d'homogénéité (analyse de variance, ANOVA), suivi d'un test PLSD de Fisher. Pour les résultats de l'étude fonctionnelle, de compliance et de géométrie cardiaque, les moyennes ont été comparées à l'aide du test *à posteriori* PLSD de Fisher. Pour les résultats des différents dosages biochimiques, immunologique et colorimétrique : activité enzymatique Cx43 et TNF- α , la comparaison des groupes a été réalisée avec le test non paramétrique de Mann et Whitney. Finalement, pour les résultats de l'étude vasculaire, les groupes ont été comparés en utilisant le test de Benferroni.

Pour toutes les analyses statistiques, la limite de significativité est fixée à $p=0,05$ excepté pour les tests non paramétriques dont la limite est fixée à $p=0,01$.

<i>Superoxyde dismutase</i>	
Tampon de dosage	Tris Base 50 mM DTPA 1mM Ajusté à pH=8,2 avec de l'acide cacodylique (dimethylarsinic acid, C ₂ H ₇ AsO ₂)
Solution de pyrogallol	7 mM dans HCl 0,01N
<i>Catalase</i>	
Tampon de dosage	100 mL de tampon KH ₂ PO ₄ 50 mM 150 mL de tampon Na ₂ HPO ₄ 50 mM, pH=7
Solution de H ₂ O ₂ 30%	Diluée au 1/200 ^{ème} dans le tampon de dosage
<i>Glutathion peroxydase</i>	
Tampon phosphate	KH ₂ PO ₄ 50 mM DTPA 0,5mM, pH=7
Tampon de dosage	Tampon phosphate contenant : <ul style="list-style-type: none"> - NADPH 0,3 mM final - GSH 10 mM final - GRx 0,5 U/mL final
Solution de tert-butylhydroperoxyde	20 mM
Solution d'inhibiteur	azide de sodium 10mM
<i>Thioredoxine réductase</i>	
Tampon de dosage	KH ₂ PO ₄ 50 mM EDTA 1 mM KCl 50 mM BSA 0,2 mg/mL
DTNB	
NADPH	
Solution d'inhibiteur	ATM 20 µM
Solution deTR de référence	

Tableau 1 : Solutions utilisées pour le dosage des activités des enzymes anti-oxydantes.

Chapitre I

Arythmies de reperfusion et
déphosphorylation de la connexine 43 :
implication du stress oxydant et rôle du
sélénium

1. INTRODUCTION

1.1. Troubles du rythme ventriculaire post-ischémiques

Les arythmies ventriculaires malignes (AVM) induites par la reperfusion post-ischémique sont essentiellement constituées de FV. Celles-ci interviennent rapidement après le rétablissement de la circulation coronaire et sont souvent mortelles. Le risque le plus élevé se situe durant la phase précoce du post-infarctus (Delahaye et coll. 2001). Si les mécanismes précis de ces anomalies sont controversés et non encore totalement élucidés, on sait qu'elles reflètent l'hétérogénéité de la récupération de l'excitabilité myocardique (Clements-Jewery 2005). Il est largement admis qu'une forte automaticité ou des phénomènes de réentrées jouent à ce niveau un rôle central et il a été proposé que des mécanismes électrophysiologiques incluant plus particulièrement le découplage et/ou la diminution de la conductance des gap-junctions du syncytium fonctionnel cardiaque sous l'effet de l'ischémie, seraient impliqués dans le développement de ces AVM (Clements-Jewery 2005). Depuis quelques années, la dysfonction des *syncytia* cardiaques est associée au développement de phénomènes d'arythmies (Janse 1991 ; Curtis et coll. 1993 ; Peters et coll. 1997). Toutefois, d'autres mécanismes d'ordre biochimique, impliquant la production des ERO ainsi que la surcharge calcique lors de la reperfusion, jouent également un rôle déterminant dans la genèse des AR.

1.2. Jonction communicante et troubles du rythme cardiaque

Dans le cœur, la très faible résistance électrique des gap-junctions permet la synchronisation rapide des signaux électriques de cellule à cellule de façon à coordonner les contractions (Lerner et coll. 2001). Les vagues d'excitation électrique venant du nœud sinusal envahissent de façon hiérarchisée la masse contractile du myocarde assurant ainsi la coordination du rythme cardiaque. L'ischémie myocardique modifie les propriétés électriques membranaires des différents tissus ce qui contribue au développement de phénomènes d'arythmies.

La régulation précise de la fonction de pore des JCs est critique pour le passage des signaux entre les cellules en temps et en lieu appropriés. Elle peut s'effectuer par divers stimuli tels que les changements de potentiel, de pH et de degré de phosphorylation des Cx. Nous avons précédemment vu que la protéine Cx43, la forme la plus répandue du tissu musculaire cardiaque, est localisée principalement au niveau des disques intercalaires formant le syncytium cardiaque. Elle est différenciellement phosphorylée sur une dizaine de sites à sérine ou à tyrosine. Leur niveau de phosphorylation régule non seulement la communication jonctionnelle, mais aussi leur turn-over (1-5 heures) (Saez et coll. 2005).

Des anomalies incluant des mutations ou encore des dysrégulations de la distribution et de la phosphorylation de la Cx43 ont été associées à diverses anomalies et maladies dont les AVM. Ci-dessous sont exposées les principales observations permettant de supposer que

l'apparition des troubles du rythme pourrait être facilitée par des dysrégulations de la phosphorylation des canaux formés par les Cx43.

1) Le remodelage des gap de Cx43, en perturbant de la coordination de l'excitation myocardique, augmente le risque des arythmies cardiaques (Gutstein et coll. 2001).

2) La mutation de la Cx43 chez la souris qui modélise la maladie humaine de dysplasie oculodentodigitale, entraîne une réduction significative du niveau de Cx43, essentiellement de sa forme phosphorylée, et augmente l'incidence des troubles du rythme cardiaque (Kalcheva et coll. 2007). Cette mutation affectant le domaine C terminal de la Cx43 est associée à un dysfonctionnement de l'assemblage des gap-junctions parallèlement à une diminution du couplage intercellulaire, ainsi que de la vitesse de propagation des signaux à travers les JC de Cx43.

3) Jeyaraman et coll. (2003) ont démontré que l'ischémie est associée non seulement à une déphosphorylation de la Cx43, mais aussi une diminution de la localisation des connexons de Cx43 au niveau du syncytium.

4) Dans une étude sur cœur isolé de Rat, Beardslee et coll. (2000) ont démontré que le découplage électrique induit par une ischémie globale est associé à la déphosphorylation de la Cx43. Ce découplage électrique contribue à l'apparition d'anomalies incluant des arythmies de réentrées. La reperfusion est accompagnée non seulement de la récupération des anomalies de conduction, mais aussi de la rephosphorylation de la Cx43.

5) Dans un modèle d'ischémie aiguë chez le porc, Schulz et coll. (2003) ont montré que l'ischémie induit *in vivo* une déphosphorylation de la Cx43 et que le préconditionnement ischémique (PI), qui est un processus majeur de la cardioprotection, abolit totalement cette déphosphorylation.

6) Sundset et coll. (2007) ont démontré un lien direct entre la protection cellulaire cardiaque et l'amélioration du couplage électrique des cellules ayant été soumise à un stress ischémique prolongé et un PI. Ce dernier est associé une limitation du niveau de déphosphorylation de la Cx43.

Ces résultats suggèrent que le niveau de phosphorylation des connexons pourrait être modulé par l'ischémie/reperfusion et pourrait de ce fait être impliqué directement dans l'altération de l'excitabilité myocardique et l'apparition des troubles du rythme.

Cependant, peu d'études ont fait état des conséquences de cette déphosphorylation sur la fonction contractile cardiaque ou de son lien direct avec les épisodes d'AVM. Par ailleurs, les liens directs entre l'épisode d'ischémie et cette altération de la phosphorylation ne sont pas encore totalement établis. Si la déphosphorylation de la Cx 43 semble être régulée entre autres par des phosphatases et des kinases impliquées dans le PI (Jeyaraman M et coll. 2003 ; Schulz et coll. 2003), on dispose de peu d'informations sur le(s) mécanisme(s) cellulaire(s) impliqué(s) dans cette altération.

1.3. Stress oxydant et sélénium

Parmi les divers mécanismes qui peuvent être impliqués dans l'étiologie des AR, un mécanisme biochimique impliquant des ERO a été proposé sur la base de la capacité des antioxydants à prévenir ce type d'anomalies (Clements-Jewery 2006).

Dans le rappel bibliographique, nous avons vu que par l'intermédiaire des protéines sélénium-dépendantes, le sélénium joue un rôle fondamental dans le système de protection cellulaire. En effet, le statut en sélénium est corrélé à la capacité antioxydante tissulaire (Brigelius-Flohe et coll. 2003). Le sélénium est capable de moduler à la fois la teneur des enzymes antioxydantes telles que la GSH-Px ou la TR ainsi que leur activité respective. Par ce biais, il est impliqué dans les défenses cellulaires endogènes contre les divers hydroperoxydes produits dans certaines situations physiologiques ou physiopathologiques telles que l'ischémie du myocarde et dans la régulation du statut rédox cellulaire (Papp et coll. 2007). De plus, à travers ces sélénoprotéines, il contribue à la régénération de plusieurs composés antioxydants dont l'acide ascorbique et le GSH (Meister et coll. 1994; Nordberg et Arnér 2001). Dans ce cadre, Tanguy et coll. (1998), sur un modèle d'ischémie/reperfusion *ex-vivo*, ont démontré l'existence d'une corrélation négative entre le statut sanguin en sélénium et la sévérité des AR, la limitation des AVM étant associée à un renforcement de l'activité antioxydante de la GSH-Px.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la déphosphorylation de la Cx43 serait initiée par le stress oxydant induite par la séquence d'ischémie cardiaque. Ce processus serait renforcé par la reperfusion post-ischémique et serait en partie responsable des AVM durant cette période.

2. OBJECTIF DE L'ÉTUDE

L'objectif de cette première partie de notre travail a été tout d'abord d'étudier sur un modèle expérimental simple, le cœur isolé de rat, le degré de phosphorylation de la Cx43 au cours d'un stress oxydatif aigu induit soit par des durées variables d'IG, suivies ou non de reperfusion, soit par une courte séquence d'IR suivie de reperfusion. Ensuite, nous avons cherché à établir une relation entre cette déphosphorylation et les AR. Sur un modèle d'étude des troubles du rythme ventriculaires (Tanguy et coll. 1998), les AR ont été évaluées en termes de type d'arythmies, de fréquences d'apparition et de sévérité. L'apport en sélénium des animaux utilisés a été contrôlé de façon à pouvoir établir une éventuelle relation entre l'amélioration des défenses antioxydantes cellulaires et le statut en Cx43 déphosphorée.

3. EFFETS DE LA DUREE D'ISCHÉMIE ET DE LA REPERFUSION POST-ISCHÉMIQUE SUR LE NIVEAU DE PHOSPHORYLATION DE LA CONNEXINE 43

3.1. Introduction

Différents modèles *in vitro* et *in vivo* ont été utilisés pour l'étude des phénomènes physiopathologiques associés à l'ischémie (Clements-Jewery et coll. 2005). Le modèle d'IG totale du cœur isolé de Rat a été très souvent utilisé pour l'investigation des dysfonctions contractiles cardiaques ainsi que des lésions ischémiques associées. L'IG, obtenu par l'arrêt total de la perfusion, entraîne un arrêt rapide de la contraction qui est suivi du développement d'une contracture ischémique, détectable par l'augmentation de façon abrupte de la pression ventriculaire diastolique. Dans le rappel bibliographique, nous avons vu que l'ischémie myocardique présente un caractère évolutif au cours du temps, les lésions devenant de plus en plus sévères avec l'allongement de la durée d'ischémie. Si la reperfusion la plus précoce possible constitue le seul moyen d'obtenir une récupération durable de la fonction contractile cardiaque, elle est accompagnée d'un ensemble de perturbations fonctionnelles entraînant une aggravation apparente des dommages fonctionnels et ultrastructuraux cardiaques.

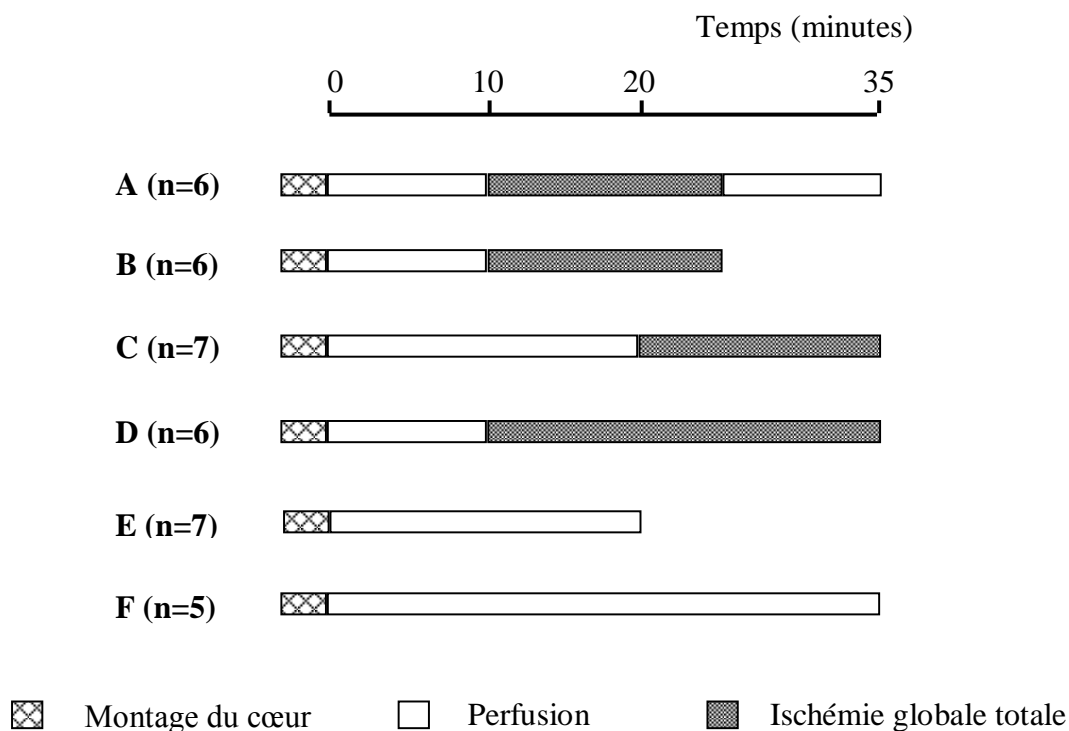
Dans cette partie de l'étude, nous avons abordé, la relation directe entre le degré de stress ischémique et le niveau de phosphorylation de la Cx43 dans le myocarde. Nous avons donc évalué l'effet de la durée d'une ischémie aiguë et sévère (IG de 15 et 25 min) puis celui de la reperfusion post-ischémique sur le niveau de la Cx43 non phosphorylée dans un modèle de cœur isolé perfusé de Rat.

3.2. Méthodes

3.2.1. Protocole expérimental

37 rats mâles adultes (poids corporel moyen : $309,81 \pm 2,19$ grammes) ayant reçu comme nourriture, le régime standard du laboratoire (UAR04 ; SAFE, France) ont été répartis

de façon aléatoire dans les différents groupes expérimentaux ci-après.



- **groupe A** : 10 min de perfusion en conditions normoxiques, puis 15 minutes d'IG suivies de 10 min de reperfusion ;
- **groupe B** : 10 min de perfusion en conditions normoxiques, puis 15 minutes d'IG ;
- **groupe C** : 20 min de perfusion en conditions normoxiques, puis 15 min d'IG ;
- **groupe D** : 10 min de perfusion en conditions normoxiques, puis 25 min d'IG ;
- **groupe E** : 20 min de perfusion en conditions normoxiques ;
- **groupe F** : 35 min de perfusion en conditions normoxiques.

NB= Les cœurs ayant eu un DC inférieur à 10 mL/min ou supérieur à 18 mL/min ont été écartés de l'étude.

Une fois la préparation de cœur isolé mise en perfusion, la FC a été imposée à 5 Hz (300 battements par minute) par un système de pacing. Pour cela, l'oreillette droite a d'abord été enlevée, puis le nœud auriculo-ventriculaire a été incisé légèrement afin de l'inactiver. Le cœur est ensuite stimulé électriquement comme décrit précédemment (2.2.6 de *Méthodes générales*). La stimulation électrique a été arrêtée pendant l'IG et restaurée après 30 secondes de reperfusion. La résistance au pacing (RP), définie comme l'absence de reprise des contractions en réponse à la stimulation électrique, a été évaluée en mesurant le temps entre le début de la stimulation et la reprise d'une contraction cardiaque normale. Cette résistance, exprimée en seconde, a été utilisée comme indice représentatif de l'apparition de FV au début de la reperfusion. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les variables représentatives de la fonction cardiaque : PDev, DC, FC et $\pm dP/dt$, de même que les variables caractéristiques

de l'ischémie : CM, DAC, DCM ont été enregistrées à partir du tracé. En fin de perfusion, les cœurs ont été rapidement congelés selon la technique décrite dans le paragraphe 3.1.1 du chapitre *Méthodes générales*.

3.2.2. Rapport GSH/GSSG tissulaire cardiaque

Les concentrations en glutathion réduit (GSH) et glutathion oxydé (GSSG) ont été dosées sur les extraits de cœurs de rats en fin d'expérimentation en utilisant le Kit GSH/GSSG-412™ (BIOXYTECH®, Oxis Health Products, Inc). Le dosage est fondé sur la réduction du DTNB (réactif d'Ellman) par 2 GSH en présence du NADPH et de la glutathion réductase (GR) en un produit coloré jaune absorbant à 412 nm, le TNB selon la réaction :

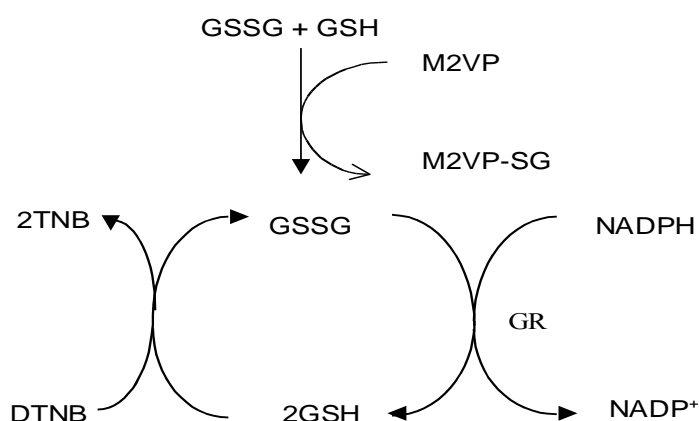


Schéma réactionnel résumant le dosage tissulaire en GSH et GSSG par spectrophotométrie.

Abréviations : **DTNB** = 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); **NADPH** = β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; **GR** = glutathion réductase; **M2VP** = 1-méthyl-2-vinylpyridinium trifluorométhanesulfonate; **GSH** = glutathion réduit; **GSSG** = glutathion oxydé; **TNB** = acide 5-thio-2nitrobenzoic.

Un homogénat tissulaire est tout d'abord obtenu par homogénéisation de 100 mg de tissu dans de l'acide métaphosphorique (MPA) (5%). Pour le dosage de GSH, l'homogénat a été dilué au 1/8^{ème} avec le MPA. Le GSH présent dans l'échantillon de dosage de GSSG a été bloqué par ajout d'un piègeur de thiols (M₂VP) (1/10^{ème}) n'interférant pas avec la GR. Les

débris cellulaires ont été ensuite éliminés par centrifugation à 1000g à 4°C pendant 10 minutes et le lysat cellulaire a été dilué respectivement au 1/61^{ème} et au 1/15^{ème} avec un tampon contenant de l'EDTA et du NaPO₄ pour les échantillons GSH et GSSG. La réaction est alors initiée en mélangeant un le réactif d'Ellman et le réducteur enzymatique avec l'échantillon. Les concentrations en GSH et GSSG sont alors déterminées en suivant la cinétique de disparition du GSSG ou du GSH par spectrophotométrie à 412 nm.

Les concentrations tissulaires en GSH puis en GSSG de chaque échantillon sont proportionnelles à la vitesse de formation du produit détectable à 412 nm. Le rapport entre la forme réduite et la forme oxydée du glutathion a été exprimé, de façon classique, à partir du calcul suivant : $[GSH - (2GSSG)] / GSSG$.

3.2.3. Dosage de Cx43 non phosphorylée par Western Immunoblotting

Les échantillons de cœurs ont été traités selon le protocole de dosage par WI décrit dans le chapitre *Méthodes générales*.

3.3. Résultats

3.3.1. Validation du modèle de stress ischémique sur cœur isolé perfusé

Les tableaux 2, 3 et 4 illustrent respectivement les paramètres représentatifs de la fonction cardiaque des cœurs isolés après 10, 20 et 35 min de perfusion en conditions normoxiques. La FC a été fixée à 300 battements par minute et la PDst imposée à 4 mmHg. A la fin des 10 min de perfusion, la PSys est voisine de 120 mmHg et le débit coronaire de 12,5 mL/min. Les cinétiques de mise en contraction et de relaxation ($\pm dP/dt$) sont respectivement de l'ordre de 5700 mmHg/s et 4100 mmHg/s. Comme le montre la figure 17, les paramètres fonctionnels cardiaques sont équivalents dans les différents groupes expérimentaux après 10, 20 ou 35 min de perfusion.

L'induction d'une IG, par interruption totale de la perfusion, entraîne une diminution rapide de la PSys ainsi que celle de la PDev, se terminant par un arrêt en diastole des cœurs

(groupes **A**, **B**, **C** et **D** ; PDst = 0 mmHg). Ensuite, la PDst augmente avec la durée de l'ischémie pour atteindre un plateau (CM). Les paramètres caractéristiques de cette contracture ischémique sont illustrés par le tableau 5. Le temps d'apparition de la contracture est retardé dans le groupe **D** comparé à l'ensemble des autres groupes, tandis que l'amplitude de la contracture est significativement abaissée dans le groupe de cœurs ayant été soumis à 20 min de perfusion normoxique suivie de 15 min d'IG (groupe **C**).

Lors de la reperfusion post-ischémique, 90% des cœurs du groupe **B** ont nécessité le recours à un stimulateur électrique pour récupérer une fonction contractile non arythmique traduisant de la présence d'AR. De plus, la reperfusion post-ischémique a entraîné la détérioration de manière significative, des paramètres fonctionnels cardiaques. Comme illustré par le tableau 8, à la fin de la reperfusion, la PDst augmente de façon significative tandis que la PDev diminue de moitié ($p < 0,05$) par rapport aux valeurs en fin de stabilisation. Par rapport aux valeurs pré-ischémiques, les récupérations de la PSys et de la PDst sont respectivement de 81% et de 51%. De même, les cinétiques de mise en contraction et de mise en relaxation sont altérées de façon significative par la reperfusion post-ischémique.

3.3.2. Rapport GSH/GSSG tissulaire cardiaque

Le tableau 7 illustre le rapport GSH/GSSG dans les échantillons tissulaires cardiaques à la fin de l'expérimentation. Dans les groupes contrôles, le glutathion cellulaire est majoritairement sous forme réduite (**F** = $272,97 \pm 66,63 \mu\text{M}$ et **E** = $282,64 \pm 129,68 \mu\text{M}$; $p > 0,05$). L'arrêt total de la perfusion cardiaque diminue significativement ce rapport (**D** = $26,55 \pm 17,37 \mu\text{M}$; **C** = $57,97 \pm 11,33 \mu\text{M}$; **B** = $69,35 \pm 20,05 \mu\text{M}$; **A** = $6,76 \pm 1,42 \mu\text{M}$). Dans ces groupes de cœurs, il décroît respectivement de 90%, de 75%, de 97% et de 79%. L'ischémie prolongée induit une déplétion marquée (**D** vs **C** ; $p < 0,05$ et **B** vs **E** ; $p < 0,05$), qui apparaît majorée de façon significative dans la phase initiale de la reperfusion (**C** vs **F** ; $p < 0,05$).

Tableau 2: Paramètres fonctionnels après 10 minutes de perfusion normoxique *ex-vivo* des groupes de cœurs de Rat.

Paramètres fonctionnels	Groupes expérimentaux					
	A (n=6)	B (n=6)	C (n=7)	D (n=6)	E (n=7)	F (n=5)
Poids (g)	312,50 ± 4,19	295,50 ± 4,88	308,57 ± 5,88	316,33 ± 1,80	310,80 ± 7,43	314,57 ± 4,74
DC (mL)	12,83 ± 0,71	13,57 ± 1,05	13,36 ± 0,85	13,23 ± 0,26	12,10 ± 1,03	12,17 ± 0,52
PDst (mmHg)	128,50 ± 5,54	128,51 ± 3,53	125,69 ± 3,26	126,03 ± 3,28	123,90 ± 7,39	124,79 ± 3,15
PDev (mmHg)	124,67 ± 5,58	125,51 ± 3,60	121,27 ± 2,96	122,78 ± 3,4	120,80 ± 7,61	119,07 ± 3,19
dP/dT max (mmHg/s)	5554,00 ± 428,76	5702,63 ± 270,47	5945,77 ± 232,70	5567,56 ± 225,16	5743,05 ± 375,94	5663,64 ± 228,60
dP/dT min (mmHg/s)	4150,00 ± 192,33	4146,36 ± 134,29	4298,07 ± 233,81	4119,39 ± 120,36	4049,00 ± 103,23	4073,96 ± 96,94

DC = débit coronaire; PSys = pression systolique du ventricule gauche; PDev = pression ventriculaire gauche développée, dP/dT max et min : les dérivées premières de la pression systolique du ventricule gauche.

A = groupe de perfusion 10 min suivie d'ischémie globale 15 min et de 10 min de reperfusion; B = groupe de perfusion 10 min suivie de 15 min d'ischémie globale ; C = groupe de perfusion 20 min, ischémie globale 15 min ; D = groupe de perfusion 10 min, ischémie globale 25 minutes ; E = groupe de perfusion 20 min ; F = groupe de perfusion 35 min.

Tableau 3 : Evolution des paramètres fonctionnels de cœurs isolés de Rat perfusés pendant 35 minutes en conditions normoxiques.

Temps de perfusion	Paramètres fonctionnels					
	DC (mL)	PSys (mmHg)	PDst (mmHg)	PDev (mmHg)	dP/dT max (mmHg/s)	dP/dT min (mmHg/s)
10 min	12,17 ± 0,52	124,79 ± 3,15	4,00 ± 0,00	119,07 ± 3,19	5663,64 ± 228,60	4073,96 ± 96,94
20 min	11,70 ± 0,41	120,43 ± 1,95	5,07 ± 1,36	115,36 ± 1,80	5371,64 ± 124,44	3980,64 ± 88,48
35 min	12,26 ± 0,75	122,79 ± 4,18	5,36 ± 1,27	117,43 ± 4,30	5081,57 ± 364,32	3900,00 ± 164,75
PLSD Fisher	ns	ns	ns	ns	ns	ns

DC = débit coronaire; PSys = pression systolique du ventricule gauche; PDst= pression ventriculaire en fin de diastole ;
PDev = pression ventriculaire gauche développée ; dP/dT max et min = les dérivées premières de la pression systolique du ventricule gauch

Tableau 4 : Paramètres fonctionnels de cœurs isolés de Rat évalués à 20 minutes de perfusion normoxique.

Paramètres fonctionnels	10 min de perfusion normoxique			20 min de perfusion normoxique		
	Groupe C (n=7)	Groupe E (n=5)	Groupe F (n=7)	Groupe C (n=7)	Groupe E (n=5)	Groupe F (n=7)
DC (mL)	13,36 ± 0,85	12,10 ± 1,03	12,17 ± 0,52	13,17 ± 0,69	12,20 ± 1,12	11,70 ± 0,41
PDst (mmHg)	4,41 ± 0,41	3,10 ± 0,33	4,00 ± 0,00	4,49 ± 0,49	3,07 ± 0,44	5,07 ± 1,36
PSys (mmHg)	125,69 ± 3,26	123,90 ± 7,39	124,79 ± 3,15	123,82 ± 3,82	121,05 ± 7,54	120,43 ± 1,95
PDev (mmHg)	121,27 ± 2,96	120,80 ± 7,61	119,07 ± 3,19	119,33 ± 3,54	117,98 ± 7,95	115,36 ± 1,80
dP/dT max (mmHg/s)	5945,77 ± 232,70	5743,05 ± 375,94	5663,64 ± 228,60	5615,22 ± 360,96	5491,80 ± 368,72	5371,64 ± 124,44
dP/dT min (mmHg/s)	4298,07 ± 233,81	4049,00 ± 103,23	4073,96 ± 96,94	3984,97 ± 348,61	4062,83 ± 241,18	3980,64 ± 88,48

C = groupe de perfusion 20 min, ischémie globale 15 min ; E = groupe de perfusion 20 min ; F = groupe de perfusion 35 min.

CF = débit coronaire; DC = débit coronaire; PSys = pression systolique du ventricule gauche; PDst= pression ventriculaire en fin de diastole ; PDev = pression ventriculaire gauche développée ; dP/dT max et min = les dérivées premières de la pression systolique du ventricule gauche.

3.3.3. Niveau de phosphorylation de la Cx43

Les bandes qui apparaissent autour de 41 kDa sur les films autoradiographiques obtenus après WI représentent la Cx43 non phosphorylée. La densité de ces bandes a été quantifiée et présentée sous forme d'unité arbitraire (UA). Ce dosage semi-quantitatif, donne une idée de la teneur tissulaire en Cx43 non phosphorylée dans nos différents groupes expérimentaux (tableau 8). Le bruit de fond des films a été corrigé et un contrôle interne a été utilisé de manière à pouvoir comparer les valeurs de densité obtenues pour chaque film.

La forme déphosphorylée de la Cx43 a été détectée dans les cœurs normoperfusés de même que dans les cœurs ischémiques. On observe respectivement une densité de bandes migrant à 41 kDa de $0,17 \pm 0,16$ (UA) et de $0,52 \pm 0,10$ (UA) dans les échantillons issus de cœurs perfusés dans des conditions normoxiques (groupes **E** et **F**). La teneur en Cx43 non phosphorylée dans le tissu cardiaque est équivalente à 20 et 35 minutes de perfusion normoxique. Quand on compare les cœurs normoperfusés (groupes **E** et **F**) aux cœurs ischémiques, les bandes migrant à 41 kDa, sont significativement plus denses pour les échantillons de cœurs ayant été soumis à 15 ou 25 minutes d'ischémie (**C** et **D**). L'IG augmente donc la densité en Cx43 déphosphorylée dans le tissu cardiaque. Par ailleurs, la reperfusion entraîne une augmentation (6 fois) de l'intensité de bandes de Cx43 non phosphorylée (**A** vs **E** et **F** $p < 0,01$). Enfin, on note une nette différence d'intensité entre les groupes de cœurs ayant été soumis à 15 min d'IG (**B** vs **C** $p < 0,01$) en faveur d'une plus faible densité dans le groupe préalablement perfusé pendant 20 min (**C**).

3.4. Discussion/Conclusion

Dans notre travail, la baisse progressive du rapport GSH/GSSG au cours de l'ischémie traduit un stress oxydatif cellulaire proportionnel à la durée de l'ischémie. En effet, le GSH, qui fait partie du système de défense antioxydante cellulaire (Rueckschloss et coll. 2003), est un tripeptide soufré (γ glutamyl-cystéine-glycine) capable de contrer les processus oxydatifs. Grâce à sa fonction thiol libre, il est oxydé en dissulfide (GSSG) par la GSH-Px. Le GSSG est recyclé par la GR qui consomme le NADPH comme co-facteur. Le rapport glutathion réduit sur glutathion oxydé (GSH/GSSG) est donc un excellent marqueur du stress oxydant et reflète également de façon indirecte le potentiel rédox cellulaire.

Ainsi, les différents résultats obtenus - de l'évaluation de la fonction cardiaque et de la détermination du rapport GSH/GSSG tissulaire - mettent en évidence un niveau de stress ischémique qui augmente avec la durée de l'ischémie et est aggravé par la reperfusion. En effet, dans nos conditions expérimentales, la durée du stress ischémique est corrélée à la sévérité de la dysfonction contractile induite par l'ischémie aiguë. Par ailleurs, la reperfusion post-ischémique du tissu cardiaque entraîne non seulement une aggravation de cette dysfonction mais aussi à l'apparition de troubles du rythme ventriculaire.

Ces différentes observations sont en total accord avec les résultats rapportés dans la littérature (pour revue voir : Venardos et coll. 2007 et Clements-jewery et coll. 2005).

La forme déphosphorylée de la Cx43 est augmentée par l'ischémie à durée d'expérimentation égale. Bien que non significativement non différente, la reperfusion post-ischémique intensifie cette déphosphorylation. L'intensité du stress oxydant lié à l'ischémie semblerait donc influencer le degré de déphosphorylation de la Cx43. En effet, puisque l'IG produit un stress oxydatif dont l'intensité varie avec la durée d'ischémie et le rétablissement de la perfusion coronaire, nous pouvons suggérer que le niveau de stress consécutif à l'ischémie affaiblirait le pouvoir réducteur de la cellule qui favoriserait alors le passage de la forme phosphorylée de la Cx43 en sa forme déphosphorylée. L'exagération de l'effet de déphosphorylation par la reperfusion irait dans cette voie.

Par ailleurs, une perfusion pré-ischémique plus longue (20 min vs 10 min) semble freiner l'évolution de la déphosphorylation de la Cx43 tissulaire cardiaque au cours de l'ischémie. Cet effet bénéfique est accompagné d'une moindre déphosphorylation de la Cx43. Ces résultats suggèrent que la teneur myocardique en Cx43 déphosphorylée est associée à la sévérité de la contracture ischémique.

En résumé, les résultats présentés dans ce sous chapitre mettent en évidence différents niveaux de stress au niveau du myocarde induits aussi bien par des durées croissantes d'ischémie que par la reperfusion post-ischémique. Ces résultats nous ont permis de valider nos modèles expérimentaux de stress ischémique et d'obtenir différents degrés de stress (A > B ≥ D > C > F > E) qui influencent de façon significative le degré de phosphorylation de la Cx43.

Tableau 5 : Effet de la durée de l'ischémie sur les paramètres caractéristiques de la contracture ischémique.

Contracture ischémique	Groupes expérimentaux				stats
	A (n=6)	B (n=6)	C (n=7)	D (n=6)	
DAC	10,32 ± 0,92	8,89 ± 0,76	9,00 ± 0,90	12,82 ± 1,34*	*vs B, C
DMC	13,39 ± 0,50	14,19 ± 0,68	13,42 ± 0,52	18,57 ± 1,25*	*vs A, B, C
MC	85,98 ± 7,78	79,42 ± 1,52	64,51 ± 5,66**	74,55 ± 6,76	** vs B, A

DAC = délai d'apparition de la contracture ; DMC = délai de mise en contracture maximale ; CM = contracture maximale. Contracture = 2*PDst en fin de stabilisation.

A = groupe de perfusion 10 min suivie d'ischémie globale 15 min et de 10 min de reperfusion ; B = groupe de perfusion 10 min suivie de 15 min d'ischémie globale; C = groupe de perfusion 20 min, ischémie globale 15 min ; D = groupe de perfusion 10 min, ischémie globale 25 minut

Tableau 6 : Effet de la reperfusion après une courte période d'ischémie sur les paramètres fonctionnels (groupe B).

CF = débit coronaire; DC = débit coronaire; PSys = pression systolique du ventricule

Paramètres fonctionnels	Fin de stabilisation	Fin de reperfusion	Statistiques
DC (mL)	13,57 ± 1,05	13,50 ± 0,77	ns
PDst (mmHg)	3,83 ± 0,75	43,92 ± 11,94	<0,05
PSys (mmHg)	127,18 ± 3,95	103,42 ± 4,74	<0,05
PDev (mmHg)	125,51 ± 3,60	66,83 ± 16,34	<0,05
dP/dT max (mmHg/s)	5702,63 ± 270,47	1017,11 ± 199,76	<0,05
dP/dT min (mmHg/s)	4169,96 ± 122,42	731,90 ± 105,35	<0,05

gauche; PDst= pression ventriculaire en fin de diastole ; PDev = pression ventriculaire gauche développée ; dP/dT max et min = les dérivées premières de la pression systolique du ventricule gauche.

ns= non significatif.

Tableau 7 : Effet de la durée d'ischémie globale et de la reperfusion sur les concentrations tissulaires en glutathion oxydé et réduit.

Groupes expérimentaux	Statut redox cellulaire		
	GSH (µM)	GSSG (µM)	GSH/GSSG
F (n=6)	299,45 ± 44,78	1,40 ± 0,31	272,97 ± 66,63
E (n=5)	679,23 ± 37,30	4,20 ± 1,75	282,64 ± 129,68
D (n=6)	165,69 ± 36,94	4,83 ± 1,14	26,55 ± 17,37*
C (n=6)	362,98 ± 42,71	6,81 ± 0,96*	57,97 ± 11,33*
B (n=6)	533,11 ± 98,31	8,52 ± 1,64 *	69,35 ± 20,05*
A (n=6)	42,56 ± 7,08	3,61 ± 0,18	6,76 ± 1,42*

A = groupe de perfusion 10 min suivie d'ischémie globale 15 min et de 10 min de reperfusion; B = groupe de perfusion 10 min suivie de 15 min d'ischémie globale ; C = groupe de perfusion 20 min, ischémie globale 15 min ; D = groupe de perfusion 10 min, ischémie globale 25 minutes ; E = groupe de perfusion 20 min ; F = groupe de perfusion 35 min. GSH= glutathion réduit, GSSG= glutathion oxydé ; GSH/GSSG= rapport glutathion réduite sur oxydé. *<0,05 vs E.

Tableau 8 : Effet de la durée d'ischémie globale et de la reperfusion sur la teneur tissulaire en Cx43 déphosphoylée de cœurs de rats perfusé *ex-vivo*

Groupes expérimentaux	A (n=5)	B (n=6)	C (n=6)	D (n=6)	E (n=5)	F (n=6)
Densité des bandes (UA)	3,66 ± 0,82	3,98 ± 1,90	1,01 ± 0,09	1,30 ± 0,17	0,17 ± 0,16	0,52 ± 0,10

AU = unité arbitraire

F = groupe de perfusion 35 min; E = groupe de perfusion 20 min ; C = groupe de perfusion 20 min, ischémie globale 15 min ; D = groupe de perfusion 10 min, ischémie globale 25 minutes ; B = groupe de perfusion 10 min suivie de 15 min d'ischémie globale ; A = groupe de perfusion 10 min suivie d'ischémie globale 15 min et de 10 min de reperfusion.

4. EFFET DU SÉLÉNIUM SUR LE NIVEAU DE PHOSPHORYLATION DE LA CONNEXINE 43 : RELATION AVEC LES ARYTHMIES DE REPERFUSION

4.1. Introduction

Le sélénium est un élément trace fondamental pour la santé humaine. A ce jour, la plupart des études expérimentales ou cliniques ont mis en évidence une corrélation positive entre l'apport alimentaire en sélénium et le taux plasmatique en cet élément trace (Rayman 2000). Chez l'Homme, l'apport journalier conseillé pour satisfaire les besoins d'un adulte en bonne santé est de 55-70 µg (Rayman 2000). Un apport journalier inférieur à 40 µg ou supérieur à 300 µg est considéré comme insuffisant ou à l'inverse toxique.

Depuis une vingtaine d'année, du fait de ses nombreuses fonctions et plus particulièrement de ses propriétés antioxydantes, le sélénium a été considéré comme capable de prévenir les maladies cardiovasculaires. Un grand nombre d'études *ex-vivo* ont d'ailleurs montré que la supplémentation a un effet bénéfique contre les conséquences cytotoxiques de l'ischémie/reperfusion (pour revue voir : Venardos et coll. 2007). Ainsi, un apport alimentaire quotidien de 150 µg pendant 10 semaines limite de façon significative non seulement les AR (Tanguy et coll. 1998), mais aussi la taille de la nécrose (Tanguy et coll. 2004) sur différents modèles d'ischémie/reperfusion. De façon plus intéressante, la supplémentation en sélénium (400µg/jour pendant 7 jours) avant une chirurgie réparatrice, augmente significativement le statut antioxydant et améliore la récupération post-chirurgicale chez 46 patients souffrant de problèmes cardiaques (Liu et coll. 2000).

Dans la précédente section, nous avons montré que les dysfonctions rythmique et contractile cardiaques induites par un stress oxydatif aigu consécutif à une ischémie ou ischémie/reperfusion, sont associées à un niveau accru de Cx43 déphosphorylée. Afin de déterminer la relation entre cette déphosphorylation et les AR, nous nous sommes intéressés à l'implication du stress oxydatif lié à la reperfusion dans le développement des arythmies ventriculaires et dans la déphosphorylation des Cx43 myocardique. Dès lors, deux régimes alimentaires contenant du sélénium dans les limites des fourchettes nutritionnelles ont été utilisés -un régime appauvri (0,05mg/kg) et enrichi (1,5 mg/kg)- afin de moduler les défenses antioxydantes cellulaires sachant que le besoin alimentaire en sélénium chez le Rat est en moyenne de 100µg/jour. Les arythmies cardiaques liées à la reperfusion ont été évaluées en

terme de fréquence d'apparition, de sévérité et de durée dans un modèle d'étude simplifié *ex-vivo* chez le rat (Tanguy et coll. 1996).

4.2. Protocole expérimental

39 rats mâles adultes (poids corporel moyen de $447,65 \pm 4,45$ grammes) ont été répartis de façon aléatoire dans deux groupes expérimentaux suivant l'apport en sélénium (**Bas-Se : animaux recevant un régime appauvri en sélénium ; n=15 et Haut-Se : animaux recevant un régime enrichi en sélénium ; n=14**). Les deux groupes ont eu une croissance comparable durant les 8 semaines de régime (voir article : *Table 1*).

A la fin du régime, les animaux ont été sacrifiés, puis les cœurs ont été préparés et perfusés selon la méthode décrite dans le paragraphe 2.2.4 de *Méthodes générales*. Dans cette partie de l'étude, un modèle d'ischémie/reperfusion *ex-vivo* et plus précisément un modèle d'étude des AR décrit par Tanguy et coll. (1998) a été utilisé. En effet, l'ischémie/reperfusion est plus proche de la situation clinique. Les troubles du rythme induits par la reperfusion post-ischémique ont été analysés durant les 3 premières minutes de la reperfusion. Puis, le rapport GSH/GSSG, le niveau de Cx43 déphosphorylée ainsi que l'activité tissulaire cardiaque GSH-Px ont été évalués dans les ventricules droit (VD) et gauche (VG) une fois l'expérimentation à son terme. Le sélénium plasmatique ainsi que l'activité GSH-Px nous permettent de valider notre modèle de renforcement en antioxydant endogène par la supplémentation en sélénium. Le sélénium plasmatique a été dosé au préalable, par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique selon la méthode décrite par Ducros et Favier. (1992) alors que l'activité GSH-Px a été mesurée selon la méthode décrite dans le chapitre *Matériels et Méthodes*.

4.3. Résultats

4.3.1. Validation du modèle de supplémentation en sélénium

Ce régime nous a permis d'obtenir d'une part, deux lots distincts d'animaux en termes de taux plasmatique en sélénium et d'activité cardiaque de la GSH-Px et d'autre part, deux groupes d'animaux statistiquement comparables en termes de fonction cardiaque. Les 8 semaines de contrôle de l'apport alimentaire en sélénium (0,050 et 1,50 mg/kg) augmentent

significativement la concentration plasmatique en cet élément chez les rats Haut-Se (voir article : *Table 1*) parallèlement à celle de l'activité cardiaque de la GSH-Px (+ 13% ; $p < 0,01$). Néanmoins, les paramètres hémodynamiques cardiaques, mesurés à la fin de la période de perfusion normoxique, sont statistiquement équivalents pour les deux groupes de rats : Haut-Se et Bas-Se (Tableau 9).

Finalement, notre modèle *ex-vivo* d'ischémie/reperfusion (10 min de stabilisation, puis 10 min d'IR suivie de 10 min de reperfusion) a été validé : (i) par la réduction de près de 50% du DC (Tableau 11), (ii) par le développement d'AR, essentiellement des FV, au cours des 3 premières minutes de la reperfusion (ci-dessous).

4.3.2. Arythmies de reperfusion

Le tableau 10 illustre les fréquences d'apparition de ces anomalies. Dans près de la moitié des cas, elles sont irréversibles pour le groupe Low-Se. L'enrichissement du régime alimentaire en sélénium diminue de 31 % (ns) l'incidence totale des VF totales (groupe Haut-Se). Chez ces animaux, la fréquence d'apparition des VFI est décalée vers les troubles du rythme de moindre sévérité (FVR + TV).

La sévérité des AR est illustrée par la figure 16A. Les cœurs du groupe Bas-Se sont tous répartis dans les catégories représentant les arythmies les plus sévères (Score 2, 3 et 4), tandis que ceux du groupe Haut-Se sont répartis majoritairement dans le score 3. Ces résultats sont confirmés par le calcul du score moyen obtenu dans chaque groupe (figure 16B).

4.3.3. Pool tissulaire en groupement thiol (rapport GSH/GSSG)

Bien que de façon non significative, la supplémentation en sélénium diminue le statut myocardique en GSH, aussi bien dans le VD que dans le VG (Tableau 11). De même, on note une tendance à la baisse de la concentration tissulaire cardiaque en GSSG dans ce même groupe. Cependant, cette différence n'est pas significative. Quel que soit le groupe considéré, la teneur en GSSG reste comparable.

Le rapport GSH/GSSG des deux groupes de cœurs est altéré par l'ischémie/reperfusion (VG) par rapport aux contrôles (VD). Cette baisse est comparable dans les deux groupes de cœurs.

Tableau 11 : Evolution des paramètres fonctionnels de cœurs isolés perfusés de Rat durant le protocole expérimental.

Groupes expérimentaux	Stabilisation		Ischémie		Reperfusion	
	DC	FC	DC	FC	DC	FC
	(mL/min)	(bts/min)	(mL/min)	(bts/min)	(mL/min)	(bts/min)
Bas-Se (n=15)	13,56 ± 1,30	308,00 ± 15,00	7,90 ± 0,84*	302,00 ± 15,00	14,80 ± 1,45	280,00 ± 17,00
Haut-Se (n=14)	14,12 ± 1,29	300,00 ± 12,00	8,40 ± 0,98*	284,00 ± 12,00	14,20 ± 0,80	300,00 ± 13,00

Stabilisation= fin de perfusion en conditions normoxiques ; Ischémie = après 10 min d'ischémie régionale ; Reperfusion= après 10 min de reperfusion ; DC= débit coronaire ; FC= fréquence cardiaque. Les groupes expérimentaux ont été définis dans le protocole expérimental.

112

Tableau 12 : Incidence des arythmies de reperfusion.

Groupes expérimentaux	Fréquence d'apparition des arythmies (%)		
	Tachycardie Ventriculaire	Fibrillation Ventriculaire Totale	Fibrillation Ventriculaire Irréversible
Bas-Se (n=15)	7,69	76,92	46,16
Haut-Se (n=14)	36,36	45,45	27,27

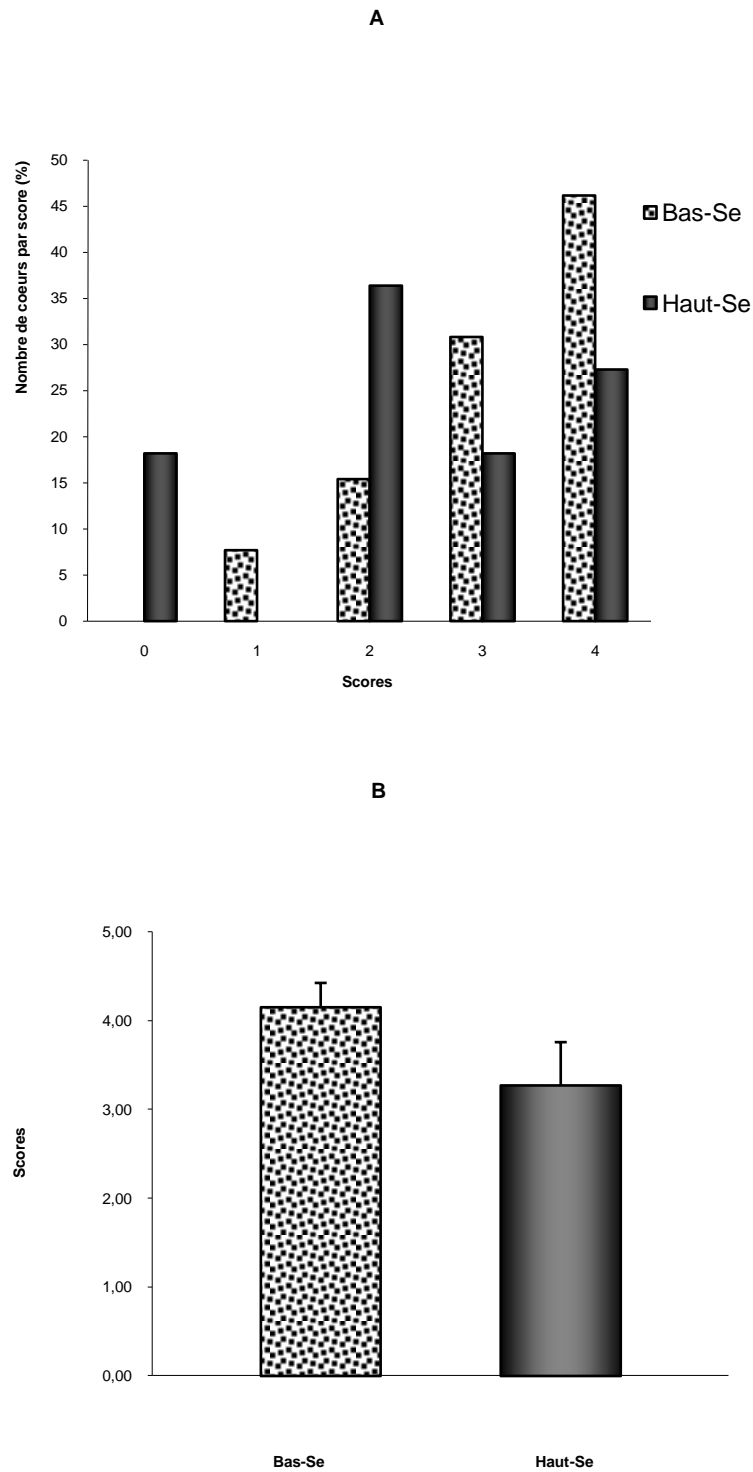


Figure 15 : Effet du sélénium sur la sévérité des arythmies de la reperfusion.

Les groupes sont définis dans le protocole expérimental. A/ Représente la répartition (en pourcentage) des coeurs dans les différent scores. B/ Représente les scores moyens des arythmies de la reperfusion. Moyenne \pm SEM ; p, test de Student.

Le rapport GSH/GSSG est altéré dans la zone ischémique (ZI). Bien que la supplémentation en sélénium ne semble pas interférer avec cette baisse, elle diminue le pool global en glutathion dans le cœur.

Tableau 11 : Effet de la supplémentation en sélénium les concentrations tissulaires en glutathion oxydé et réduit.

	Groupes expérimentaux			
	Bas-Se (n=12)		Haut-Se (n=10)	
	VD	VG	VD	VG
GSH	588,02 ± 65,95	388,84 ± 65,41	421,94 ± 93,44	362,10 ± 56,94
GSSG	14,75 ± 2,31	10,56 ± 1,27	11,33 ± 4,06	10,71 ± 3,20
GSH/GSSG	46,73 ± 6,90	37,06 ± 6,89	61,12 ± 15,02	40,27 ± 7,55*

GSH= glutathion réduit, GSSG= glutathion oxydé ; GSH/GSSG= rapport glutathion réduite sur oxydé ; VD= ventricule droit ; VG= ventricule gauche.
Les groupes ont été définis dans les méthodes.

4.3.4. Niveau de phosphorylation de la Cx43

Les résultats sont présentés sous forme d'un article : « **Selenium status as determinant of Connexin-43 dephosphorylation in ex vivo ischemic/reperfused rat myocardium.** »

Rakotovao A, Tanguy S, Toufektsian M-C, Berthonneche C, Ducros V, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F. J Trace Elem Med Biol 19 (2005) 43-47.

Une différence quantitative de Cx43 déphosphorylées est observée entre les ZI et ZN des cœurs du groupe Low-Se (voir article : *figure 1*). Pour une même quantité en protéines (25 µg), la ZI présente une densité plus forte en bandes migrant à 41 kDa (1,42UA) que le ventricule droit (0,57UA). Cette variation n'est pas significative chez le groupe d'animaux Haut-Se (0,27 UA pour le VG vs 0,23 UA pour le VD.). Le niveau de Cx43 déphosphorylées des ZI du groupe Haut-Se est ramené au même niveau que celui des ZN du groupe Bas-Se (cf. article : *figure 1*).



SECOND INTERNATIONAL FESTEM SYMPOSIUM

**Selenium status as determinant of Connexin-43 dephosphorylation
 in ex vivo ischemic/reperfused rat myocardium**

 Andry Rakotovo^a, Stéphane Tanguy^{a,b}, Marie-Claire Toufektsian^a,
 Corinne Berthonneche^a, Véronique Ducros^c, Arpad Tosaki^d, Joël de Leiris^a,
 François Boucher^{a,*}
^aLaboratoire NVMC-EA 3746, IFRT 130 Ingénierie pour le Vivant, Bâtiment Jean Roget-Domaine de la Merci,
 Université Joseph Fourier, 38700 La Tronche, France

^bLaboratoire de Physiologie des Adaptations Cardiovasculaires à l'Exercice, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Avignon,
 France

^cDépartement de Biologie Intégrée, Centre Hospitalier Régional de Grenoble, Grenoble, France

^dDepartment of Pharmacology, Health Science Centre, University of Debrecen, Hungary

Abstract

Recent studies have demonstrated that electrical uncoupling at gap junctions during ischemia is associated with cardiac Connexin-43 (Cx43) dephosphorylation. Whether oxidative stress is involved in this phenomenon still remains unclear. In the present study, we examined the influence of selenium intake on reperfusion-induced Cx43 dephosphorylation. Male Wistar rats were fed a diet containing either 0.05 mg/kg (Low-Se, $n = 13$) or 1.5 mg/kg (High-Se, $n = 11$) selenium for 8 weeks. At the end of this diet, hearts were isolated and subjected to 10 min regional ischemia followed by 10 min reperfusion. The level of dephosphorylated Cx43 was determined in tissue samples from ischemic/reperfused and non-ischemic regions of the hearts. At the end of the experimental diet, the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) was increased in high-Se hearts compared with low-Se hearts (+13%; $p < 0.05$). After ischemia/reperfusion, in low-Se hearts, Cx43 dephosphorylation appeared significantly increased in the left ventricle compared to the non-ischemic right ventricle (+149%; $p < 0.05$). The high-Se diet significantly reduced Cx43 dephosphorylation in the left ventricle ($p < 0.05$ vs. low-Se diet). In conclusion, our results suggest that oxidative stress may be involved in Cx43 dephosphorylation during myocardial ischemia/reperfusion, thereby contributing to arrhythmogenesis.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Heart; Reperfusion injury; Selenium; Connexin-43

Introduction

Early reperfusion of the ischemic myocardium is widely recognised as the only way to restore cellular functions that have been altered by ischemia, and to

prevent the evolution of ischemic cardiomyocytes towards necrosis. Nonetheless, coronary reperfusion is frequently accompanied by various characteristic disturbances generally referred to by the term reperfusion syndrome [1] including reversible mechanical dysfunction and arrhythmias [2].

Gap junctions play an essential role for normal cardiac function, since through them major ionic fluxes between neighbouring cardiomyocytes are spread,

*Corresponding author. Tel.: +33 47663 71 17;

fax: +33 47663 71 52.

E-mail address: Francois.Boucher@ujf-grenoble.fr (F. Boucher).

Les résultats de l'étude de la fonction cardiaque nous permettent d'affirmer que le régime alimentaire enrichi en sélénium limite les FV générées par la reperfusion post-ischémique en termes de sévérité et de fréquence. Cet effet bénéfique du sélénium est en accord avec les résultats rapportés par Tanguy et coll. (1998) et conforte les effets cardioprotecteurs du sélénium.

Parallèlement, le régime enrichi en sélénium renforce le statut plasmatique en sélénium ainsi que l'activité GSH-Px et limite la déphosphorylation des Cx43 myocardiques induite par l'ischémie/reperfusion dans nos conditions expérimentales. Nos résultats suggèrent donc que le sélénium en préservant l'équilibre rédox de la cellule favoriserait une moindre déphosphorylation des Cx43 qui serait à l'origine d'une diminution des troubles du rythme ventriculaires.

5. DISCUSSION

Rappel des résultats

Des degrés différents de stress ischémique évalués, en termes d'altération de la fonction diastolique cardiaque et de statut rédox, ont pu être obtenus sur nos préparations de cœur isolé de Rat. Ces niveaux de stress influencent parallèlement, de façon négative et significative le degré de phosphorylation de la Cx43 et ceci en fonction du degré de stress.

Dans un modèle d'étude des AR, nous avons pu montrer qu'une supplémentation alimentaire en sélénium (1,5 mg/kg de régime) de 10 semaines limite la sévérité et l'incidence des troubles du rythme cardiaque, en parallèle avec une augmentation du taux plasmatique en sélénium et une amélioration de l'activité antioxydante de la GSH-Px. De plus, cette limitation est associée à une normalisation de la teneur en Cx43 non phosphorylées dans le tissu cardiaque ischémique.

Dans le coeur normal, cette protéine est majoritairement sous sa forme phosphorylée. En complément avec d'autres travaux (Beardslee et coll. 2000 ; Lerner et coll. 2001 ; Jeyaraman et coll. 2003 ; Schulz et coll. 2003), nos résultats confortent l'hypothèse que l'ischémie induit sa déphosphorylation. Cependant, dans notre étude, les résultats de dosage du niveau de phosphorylation de la Cx43 au moment de la reperfusion sont en contradiction avec les résultats de Saez et coll. (2005) qui observe que la reperfusion post-ischémique est capable de rétablir le niveau de phosphorylation de Cx43. Nous pouvons supposer que les 10 min de reperfusion dans notre protocole expérimental sont insuffisantes pour permettre un turn-over complet de la Cx43 (1 à 5 heures).

Les conséquences fonctionnelles de la déphosphorylation de la Cx43 durant l'ischémie restent controversées. Il n'est pas totalement établi que cette déphosphorylation résulte en une ouverture ou une fermeture du canal formé par les Cx43. Toutefois, un consensus s'accorde à dire que l'ischémie initie leur fermeture (Beardslee et coll. 2000). De plus, il a été suggéré que la phosphorylation de la Cx43 lui permet son maintien dans l'espace cytosolique, étape préalable à sa translocation membranaire, tandis que la déphosphorylation constitue un signal de désassemblage et de dégradation de la JC formée par les Cx43 (Huang et coll. 1999; Saez et coll. 2005). Cette déphosphorylation, principalement au niveau de sa boucle N terminale (résidus sérine 325-328 ou 330), est fondamentale pour la fonction de pore (Lampe et coll. 2006) et aurait un effet inhibiteur sur la conduction rapide dans les fibres cardiaques

(Elenes et coll. 2001). Comme nous l'avons souligné, la dysfonction contractile cardiaque, les troubles du rythme ou l'altération du métabolisme cardiaque associés à l'ischémie non seulement altèrent l'excitabilité, mais réduisent le couplage électrique des cellules cardiaques. La modification de la fonction de pore qui est dépendante de l'état de phosphorylation de la Cx diminuerait donc la communication intercellulaire et contribuerait (i) à la diminution de la vitesse de la conduction, (ii) à une conduction anarchique du potentiel d'action et (iii) à la modification des propriétés de la période réfractaire (Poelzing et Rausenbaum 2004). En conséquence, l'activité contractile du myocarde entre la ZI, la zone bordante et la ZN serait différente entraînant une perturbation du synchronisme cardiaque. La préservation de la Cx43 à l'état phosphorylé par une augmentation de l'activité GSH-Px contribue vraisemblablement, à la limitation d'au moins deux de ces facteurs (dysfonction contractile cardiaque, troubles du rythme) et suggère une implication du statut rédox intracellulaire dans la fonction de canal des JCs cardiaques.

A ce jour, l'implication des ERO produites lors de la séquence d'ischémie dans la dysfonction contractile cardiaque est largement admise (Ceconi et coll. 2003). Elles contribueraient également dans le développement des AR (Venardos et coll. 2007). Du fait de leur pouvoir oxydant, les ERO ont une part importante dans l'initiation et l'établissement des lésions membranaires. Les altérations structurales (sarcomères et membranes) consécutives au stress oxydant sont responsables des perturbations des conductances ioniques favorisant une hétérogénéité de l'activité contractile du myocarde (Manning et coll. 1984 ; Hagar et coll. 1991 ; Tanguy et coll. 1996). Par ailleurs, l'inactivation des protéines parmi lesquels les enzymes antioxydantes, favorise la dérégulation non seulement de la détoxification de la cellule mais surtout de la signalisation cellulaire. Le niveau de phosphorylation de la Cx43 dépend de l'équilibre entre la phosphorylation par les kinases (protéine kinase C, MAPK) et la déphosphorylation par les phosphatases (type PP1). Il est donc possible que l'augmentation du stress oxydant induite par l'ischémie et ou ischémie/reperfusion contribue à la fermeture des JCs de Cx43 au niveau des disques intercalaires via l'activation des phosphatases sensibles au stress. Le renforcement du statut rédox intracellulaire par le sélénium, via la voie dépendante du PKC, favoriserait non seulement la préservation des Cx43 au niveau du syncytium, mais aussi la réorganisation membranaire des JCs de Cx43 au niveau de la membrane plasmique (Lin et coll. 2003 ; Schulz et coll. 2007). En effet, il a été démontré dans le cerveau, que les canaux de Cx43 contribuent à la résistance cellulaire contre tous types de stress (ERO, Ca, radiation ionisante...). Les mécanismes de cardioprotection liés à la préservation de cette déphosphorylation n'ont pas été précisés. Ainsi, des expériences *in-vitro* et *in-vivo* ont montré

que la préservation de l'état de phosphorylation des hémicanaux formés par les Cx43 est fortement impliquée dans la cardioprotection initiée par le PI (Schulz et coll. 2007). Le PI a été décrit comme un processus puissant de cardioprotection induisant la diminution de la taille de nécrose et la limitation des AVM en impliquant les EROs (Hagar et coll. 1991 ; Wu et coll. 2002). En accord avec diverses précédentes études (Tanguy et coll. 1998 et 2004), nos résultats suggèrent que le sélénium protégerait le cœur de la même manière que le PI. Bien que nous n'ayons pas réalisé une mesure directe des EROs produits sur notre modèle expérimental, ces résultats démontrent l'existence d'un lien entre le stress oxydant et la déphosphorylation de la Cx43 mettant à jour une voie d'implication supplémentaire du stress oxydant dans l'établissement des AR.

6. CONCLUSION

En conclusion, l'ensemble de nos résultats permet de suggérer qu'il existe une relation entre les troubles du rythme cardiaque à la reperfusion, le stress oxydatif et la déphosphorylation de la Cx43. En accord avec la littérature, le stress ischémique entraîne une déplétion du pouvoir réducteur cellulaire traduisant un stress oxydatif, exacerbé par la reperfusion post-ischémique. Vraisemblablement, la baisse du statut rédox cellulaire est accompagnée d'AVM et d'une augmentation significative de la forme déphosphorylée de la Cx43 dont l'intensité augmente avec la sévérité du stress. L'ensemble de ces dysfonctions est préservé par l'augmentation du statut plasmatique en sélénium ainsi que de l'activité cardiaque en GSH-Px confirmant l'hypothèse d'une implication d'un mécanisme oxydatif dans la déphosphorylation du gap 43. Le sélénium en améliorant la balance rédox au sein du tissu cardiaque favoriserait une stabilisation à la normale des concentrations intracellulaires en métabolites et en ions (Ca, Na, K) via les JCs formées par les Cx43.

Chapitre II

Effet du sélénium sur les conséquences
cardiaques et vasculaires de l'infarctus du
myocarde à la phase aiguë

1. INTRODUCTION

Dans la synthèse bibliographique, nous avons vu qu'un apport insuffisant en sélénium peut avoir des effets délétères sur les fonctions cardiovasculaires (Rayman 2000 ; Flores-Matéo et coll. 2006) et qu'il a été associé à l'augmentation de la vulnérabilité à l'ischémie ou à une séquence d'ischémie/reperfusion du tissu cardiaque dans différents modèles animaux (Toufektsian et coll. 2000 ; Venardos et coll. 2004). Après près d'une décennie de recherche sur la corrélation entre le statut en sélénium et l'incidence ou le pronostic des MCV chez l'homme, un lien a été récemment établi entre la teneur en cet élément trace et l'incidence de coronaropathies (Flores-Matéo et coll. 2006). Une augmentation de près de 50 % du statut individuel en sélénium diminue d'environ 24 % les risques d'événements coronariens. Chez le rat, la supplémentation alimentaire en sélénium exerce un effet cardioprotecteur dans différents modèles expérimentaux d'ischémie/reperfusion (Tanguy et coll. 2004; Venardos et coll. 2004). Un apport alimentaire chronique en sélénium (150 µg/jour) augmente le taux sanguin de sélénium, ainsi que le niveau de protection endogène cellulaire en potentialisant l'activité des sélénoprotéines telles que la GSH-Px myocardique et probablement en recyclant les molécules antioxydantes intracellulaire améliorant par conséquent le statut redox cellulaire. L'augmentation de la capacité antioxydative tissulaire cardiaque a été associée à une réduction significative des AR et de la taille de l'infarctus (Tanguy et coll. 1998; Tanguy et coll. 2004; Rakotovo et coll. 2005), ainsi qu'à une amélioration/préservation de la fonction cardiaque post-ischémique (Tanguy et coll. 2004). La supplémentation en sélénium limite donc les manifestations du syndrome de reperfusion.

Ainsi, une élévation du statut corporel en sélénium pourrait théoriquement, favoriser le développement d'un remodelage non pathologique dans le post-infarctus pour aboutir à un meilleur pronostic de l'IDM. Cependant, peu d'études ont permis d'évaluer l'effet d'une supplémentation alimentaire en sélénium sur le devenir d'un IDM. La plupart des études cliniques se sont intéressées à l'effet combiné d'antioxydants (incluant le sélénium) sur les manifestations des MCV et/ou sur la mortalité globale due à ces pathologies. L'issue de ces études n'a pas été concluante et la suppression radicale des ERO s'est avérée néfaste pour l'organisme. Aussi, l'hypothèse de la nécessité des ERO dans les mécanismes d'adaptation cellulaires face au stress est de plus en plus envisagée. A travers l'activation de kinases telles que la p38 MAPK ou de facteurs de transcription comme NF-kB, elles participent de façon étroite au phénomène d'apoptose et d'hypertrophie cellulaire cardiaque. Par ailleurs, à travers les modifications intracellulaires qu'elles induisent, les ERO favorisent la libération de NF-

kB, protéine clé de la signalisation de la mort cellulaire. Or, le sélénium s'est clairement montré capable de réguler négativement NF-kB (Flohe et coll. 1997). Récemment, les travaux de Santamaria et coll. (2005) ont permis de montrer que le sélénium réduit la dégradation cellulaire d'IkB-alpha, protéine inhibitrice de NF-kB, diminuant ainsi la signalisation pro-apoptotique NF-kB.

L'hypothèse de ce travail a donc été que l'élévation du statut en sélénium (à des doses nutritionnelles) au cours d'un épisode d'ischémie/reperfusion myocardique renforcerait le processus adaptatif de cicatrisation post-infarctus en régulant à la fois les systèmes de défense antioxydante et la signalisation inflammatoire. En favorisant la défense antioxydante endogène, le sélénium limiterait non seulement les manifestations du syndrome de reperfusion mais également les conséquences post-ischémique en terme de : récupération fonctionnelle et de remodelage cardiaque précoce.

2. OBJECTIF DE L'ETUDE

L'objectif de ce chapitre a donc été de vérifier sur modèle animal entier, si une optimisation du statut en sélénium par un apport quotidien d'une dose nutritionnelle, peut limiter les conséquences du syndrome de reperfusion et améliorer ainsi la récupération post-infarctus. En utilisant deux doses de sélénium, nous avons étudié l'influence du statut en sélénium sur les altérations du système cardiovasculaire dans la phase précoce de l'IDM induit par une ischémie/reperfusion *in-vivo* chez le rat. Les effets cardioprotecteurs ont été évalués en termes de mortalité, de taille d'infarctus et de récupération de la fonction cardiaque en condition de post-charge élevée (surcharge du volume systémique). Ensuite, l'implication du sélénium dans la fonction endothéliale vasculaire a été évaluée par l'étude de la réactivité vasculaire de tronçons d'aorte thoracique intacts issus de ces animaux. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés aux mécanismes intracellulaires par lesquels le sélénium exerce ses propriétés cardioprotectrices, mécanismes qui restent très mal connus encore aujourd'hui.

3. GROUPES ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

3.1. Animaux et régimes

Des rats jeunes pesant $188,23 \pm 6,01$ g au début du traitement ont été randomisés en deux lots (Bas-Se et Haut-Se) selon qu'ils reçoivent un régime alimentaire enrichi (1,5 mg de sélénium/ kg de nourriture) ou un régime appauvri en sélénium (0,05 mg de sélénium/ kg de nourriture). La base du régime utilisée est totalement exemptée de sélénium (*TD 92163*, Harlan Teklad). Cet élément est ajouté sous forme de sélénite de sodium dans ce régime afin d'obtenir les concentrations choisies (tableau 12). Le choix de cette dose est fondé sur nos études expérimentales antérieures (chapitre I) et celles de Tanguy et coll. (1998) et de Venardos et coll. (2004). Avec ces doses nous assurons une augmentation d'au moins 10 % de l'activité GSH-Px plasmatique à l'issue des 5 semaines de régime.

3.2. Protocole expérimental

À la fin du prétraitement, les animaux de chaque lot ont été répartis de façon aléatoire soit dans un groupe soumis à une IR myocardique suivie de 8 jours de reperfusion (IM), soit dans un groupe contrôle, opéré mais non soumis à une ischémie myocardique (SHAM). Le protocole d'IR utilisé est celui de l'occlusion de l'ACG suivie de 8 jours de reperfusion décrit dans le chapitre 2.2.3 dans les *Méthodes générales*. Le choix de la durée de l'ischémie (60 min) repose sur la capacité du cœur à développer un IDM à la suite de cette période et de la reperfusion post-ischémique. Des lésions ischémiques irréversibles apparaissent à partir de 30 min chez le rat. Dans tous les cas, le régime alimentaire choisi a été maintenu pendant toute la durée de l'expérimentation et de la reperfusion.

Les différents groupes expérimentaux étudiés sont donc:

- SHAM Bas-Se: groupe contrôle nourris au régime appauvri en sélénium;
- IM Bas-Se: groupe recevant le même régime et soumis au protocole d'IR;
- SHAM Haut-Se: groupe contrôle nourris au régime enrichi en sélénium ;
- IM Haut-Se: groupe recevant le même régime et soumis au protocole d'IR.

Tableau 12 : Régimes alimentaires utilisés pour le traitement des animaux

Ingrédients	Bas-Se	Haut-Se
Levure de Torula ^a	300.0	300.0
DL-Méthionine	3.0	3.0
Sucrose	591.0	591.0
Huile de maïs	50.0	50.0
Complexe poly-vitaminique ^c	10.0	10.0
Complexe de minéraux ^b	35.0	35.0
Carbonate de calcium	11.0	11.0
Sélénite de sodium	0.0033	0.25
Références Harlan Teklad	(TD 97127)	(TD 06100)

Bas-Se = régime appauvri en sélénium (0.05 µg Se par g de nourriture); **Haut-Se** = régime enrichi en sélénium (1.5 µg Se par g de nourriture) à partir du régime exempt de sélénium (Harlan Teklad TD 92163).

^a = ce type de levure contient moins de 0.03 ppm de Se.

^b = ce mélange de minéraux (Harlan Teklad TD 40060) est exempt de sélénium et est composé en g/kg de: CaHPO₄ 500.0; NaCl 74.0; Potassium Citrate, monohydrate 220.0; K₂SO₄ 52.0; MgO 24.0; Manganous Carbonate 3.5; Ferric Citrate, USP (16.7% Fe) 6.0; Zinc Carbonate 1.6; Cupric Carbonate 0.3; KIO₃ 0.01; CrK(SO₄)₂·12H₂O 0.55; Sucrose 118.04.

^c = complexe de vitamines dépourvu de sélénium (Harlan Teklad TD 80313).

Tableau 13 : Poids et statut plasmatique en sélénium après 5 semaines de prétraitement chez le rat.

Groupes	Sélénium plasmatique (µM)	Poids corporel (g)
Bas-Se (n = 17)	3,56 ± 0,54	383,84 ± 6,07
Haut-Se (n = 24)	6,00 ± 0,50	385,85 ± 5,85
Test Mann & Whitney	<0,05	ns

Les groupes sont définis ci-dessus. Le statut en sélénium a été mesuré selon la technique décrite par Ducros et coll. (1992).

(p<0,05, Haut-Se vs Bas-Se, Mann & Whitney).

4. EFFET DU REGIME ALIMENTAIRE SUR LE STATUT EN SELENIUM

Le tableau 13 résume l'effet du régime alimentaire sur le poids des animaux et le statut plasmatique en sélénium à l'issue des 5 semaines de prétraitement.

Pendant toute la durée du prétraitement, la prise de poids de même que la prise de nourriture (25 g/jour/rat en moyenne) a été comparable dans les deux lots d'animaux (poids final-poids initial). Toutefois, en fonction du régime alimentaire, le statut plasmatique en sélénium est statistiquement différent (* $p < 0,05$). La teneur plasmatique en sélénium est augmentée par le régime enrichi en sélénium (1,5 mg/kg) à la fin de la période de prétraitement. A l'inverse, le statut plasmatique en cet élément est diminué par le régime pauvre en sélénium (0,05 mg/kg).

Le tableau 14 représente la teneur plasmatique en sélénium après 60 minutes d'IR suivie de 8 jours de reperfusion. Après l'induction de l'IDM, les régimes alimentaires ont été maintenus. Au bout des 8 jours de reperfusion post-infarctus, la teneur plasmatique en sélénium reste statistiquement comparable entre les « SHAM » et « IM » de chaque lot.

Ainsi, l'addition de sélénium dans le régime alimentaire ne semble pas générer de différence de comportement vis-à-vis de la nourriture entre nos lots d'animaux. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, ce prétraitement nous a permis d'obtenir deux lots distinctes d'animaux selon leur statut plasmatique en sélénium (statut élevé vs statut bas) que l'IDM ne semble pas modifier.

Tableau 14 : Statut plasmatique en sélénium des rats nourris au régime appauvris et enrichis en sélénium, avant et après l'induction d'un infarctus du myocarde.

Groupes	Sélénium plasmatique (μM)		Test Mann & Whitney
	Avant IDM	Après IDM	
Bas-Se (n = 17)	3,56 \pm 0,54	3,67 \pm 0,23	ns
Haut-Se (n = 24)	6,00 \pm 0,50	6,17 \pm 0,24	ns
Test Mann & Whitney	$p < 0,05$	$p < 0,05$	

Les groupes sont définis dans le paragraphe Groupes expérimentaux de ce chapitre. Le statut en sélénium a été mesuré selon la technique décrite par Ducros et coll. (1992).

5. SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DE L'INFARCTUS DU MYOCARDE A 8 JOURS POST-REPERFUSION

5.1. Introduction

Dans cette section de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de la supplémentation alimentaire en sélénium sur les modifications fonctionnelles et géométriques cardiaques apparaissant au cours de la première semaine de reperfusion post-IDM. La taille de l'IDM et la dysfonction ventriculaire gauche qui s'ensuit font parti en effet, des éléments les plus importants dans le pronostic du post-IDM (Kober et coll. 1996).

De plus, nous avons évalué les troubles du rythme ventriculaire induits au cours des 60 min d'occlusion de l'ACG, plus particulièrement durant les 15 premières min. En effet, les AVM constituent une cause majeure de la mortalité due à l'ischémie et cette étude nous permet de contrôler *in-situ*, l'effet observé précédemment (chapitre I) sur l'incidence des AR.

5.2. Méthodes

Après 8 jours de reperfusion post-ischémique, les animaux ont été traités comme décrit dans le paragraphe 2.3.4. du chapitre *Méthodes générales*. La fonction cardiaque, la compliance passive du ventricule gauche, la géométrie cardiaque ainsi que la taille d'infarctus ont été mesurées et étudiées selon les conditions expérimentales décrites dans les paragraphes 2.3.4. à 2.3.6. du chapitre *Méthodes générales*. Les mortalités opératoire (défaillance cardiaque, troubles du rythme), per-opératoire (hémorragie, pneumothorax...) et post-opératoire (insuffisance cardiaque et troubles du rythme) ont été recensées. Le taux de mortalité a été exprimé en nombre de rats morts par nombre de rats opérés selon la formule χ^2 (tableau 15), puis analysé par un test de comparaison de proportions corrigé pour la continuité par la méthode de Yates.

Tableau 15: Tableau de recensement de la mortalité des animaux au cours de l'expérimentation

	Bas-Se	Haut-Se	Somme
Morts	a	b	a+b
Survivants	c	d	c+d
Somme	a+c	b+d	Total (N)

$$\chi^2 = \frac{N (|ad - bc| - N/2)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

χ^2 est comparé à celui dans la table à 1 degré de liberté :3,84; le seuil de significativité étant cette valeur .

Tableau 16A: Taux de mortalité des animaux après l'IDM à la fin du protocole expérimental.

	Bas-Se	Haut-Se	Somme
Morts	9	2	11
Survivants	17	24	41
Somme	26	26	52

Tableau 16 B: Taux de mortalité des animaux au cours des 60 min d'ischémie *in-vivo*

	Bas-Se	Haut-Se	Somme
Morts	8	1	9
Survivants	8	12	20
Somme	16	13	29

Les groupes sont définis dans le paragraphe 3 de ce chapitre et les formules détaillées dans le paragraphe *Méthodes* de ce chapitre.

$\chi^2=4,18$

5.3. Résultats

5.3.1. Arythmies ventriculaires malignes et taux de mortalité liés à l'ischémie/reperfusion

Les taux de mortalité sont illustrés par les tableaux 16 A et B. L'analyse du taux de mortalité de nos groupes expérimentaux met en évidence une différence de sensibilité à l'ischémie en fonction du statut en sélénium. Si les taux de mortalité per-opératoire entre les deux groupes sont similaires, le taux de mortalité opératoire consécutive à l'ischémie est statistiquement inférieur dans le groupe ayant un statut élevé en sélénium par rapport à celui du groupe ayant un statut faible en sélénium (Haut-Se = 7,6 % *versus* Bas-Se = 50% ; $\chi^2 < 3,84$). Cette mortalité a été constatée majoritairement dans les 15 premières minutes de la ligature de ACG et a été causée principalement par des AVM n'ayant pas pu être réversées par une défibrillation manuelle.

Ces résultats suggèrent que le statut en sélénium peut moduler le taux de mortalité lié à l'ischémie/reperfusion dans ce type de protocole. Un statut élevé en sélénium semble limiter significativement les AVM induites par l'IR.

5.3.2. Évaluation des paramètres hémodynamiques *in-vivo*

Les paramètres hémodynamiques cardiaques mesuré *in-situ* 8 jours après le protocole chirurgical, en conditions basales, en condition de surcharge volumique et 10 min après la surcharge, sont présentés respectivement dans les tableaux 17, 18 et 19. Aucune différence notable n'est observée entre les quatre groupes en conditions basales. La surcharge volumique révèle une altération de la pression diastolique (augmentation de 3 fois) dans les deux groupes IM (figure 18). Cette augmentation est comparable entre les deux types de statut en sélénium.

Ainsi nos résultats montrent que le sélénium n'a pas d'effet sur l'évolution de l'altération diastolique post-IDM révélée par la surcharge volumique dans nos conditions expérimentales.

Tableau 17 : Effet du sélénium sur les paramètres hémodynamiques en conditions basales : mesures sur le rat anesthésié 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Groupes expérimentaux				
	SHAM Bas-Se (n= 7)	SHAM Haut-Se (n=8)	MI Bas-Se (n=7)	MI Haut-Se (n=8)
FC (bat/min)	243,46 ± 14,14	262,67 ± 19,50	233,71 ± 10,38	249,96 ± 14,80
PA (mm Hg)	72,00 ± 5,31	84,72 ± 4,74	65,47 ± 2,97	73,82 ± 4,16
PDst (mmHg)	-1,46 ± 0,60	-1,61 ± 0,8	0,48 ± -0,96	-0,94 ± 0,75
PDev (mmHg)	88,69 ± 6,31	99,52 ± 5,18	86,22 ± 4,81	98,14 ± 4,07
dP/dT min (mmHg/min)	1844,61 ± 205,68	2169,87 ± 140,67*	1511,46 ± 70,07	1995,59 ± 58,42
dP/dT max (mmHg/min)	1837,25 ± 113,00	2421,23 ± 77,04*	1749,02 ± 70,34	2156,97 ± 38,54

FC= fréquence cardiaque ; PA= pression artérielle moyenne ; PDst= pression diastolique ; PDev= pression développée ; dP/dT min= dérivée première de la pression développée.

* < 0,05 vs SHAM Bas-Se.

Tableau 18: Effet du sélénium sur les paramètres hémodynamiques en conditions de surcharge volumique : mesures sur le rat anesthésié 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Groupes expérimentaux				
	SHAM Bas-Se (n= 7)	SHAM Haut-Se (n=8)	IM Bas-Se (n=7)	IM Haut-Se (n=8)
FC (bat/min)	225,20 ± 18,15	228,79 ± 14,02	218,96 ± 8,60	233,00 ± 14,44
PA (mm Hg)	78,18 ± 8,15	93,59 ± 6,13	64,90 ± 3,06	85,28 ± 3,12
PDst (mmHg)	2,63 ± 0,59	3,08 ± 0,99	7,66 ± 0,84*	7,67 ± 1,82*
PDev (mmHg)	95,89 ± 9,44	107,35 ± 7,21	87,33 ± 3,64 [§]	125,30 ± 5,42
dP/dT min	1875,42 ± 273,00	2136,23 ± 131,25*	1376,26 ± 61,90	1768,31 ± 104,33
dP/dT max	1756,72 ± 165,32	2287,23 ± 131,02*	1574,43 ± 80,78	1860,31 ± 33,95

FC= fréquence cardiaque ; PA= pression artérielle moyenne ; PDst= pression diastolique ; PDev= pression développée ; dP/dT min= dérivée première de la pression développée.

* p < 0,05, Mann & Whitney IM vs SHAM; § p=, IM Bas-Se vs SHAM Haut-Se.

Tableau 19 : Effet du sélénium sur les paramètres hémodynamiques 10 minutes après la surcharge volumique : mesures sur le rat anesthésié 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

	Groupes expérimentaux			
	SHAM Bas-Se (n=7)	SHAM Haut-Se (n=8)	MI Bas-Se (n=7)	MI Haut-Se (n=8)
FC (bat/min)	252,84 ± 19,93	276,63 ± 18,53	243,92 ± 12,52	297,83 ± 17,07
PA (mm Hg)	84,76 ± 9,73	85,29 ± 4,42	68,59 ± 1,43	74,63 ± 3,66
PDst (mmHg)	- 1,07 ± 0,82	- 1,01 ± 0,93	1,49 ± 1,01	- 1,48 ± 0,44
PDev (mmHg)	101,50 ± 11,74	103,41 ± 3,91	86,46 ± 2,77 [§]	97,12 ± 3,54
dP/dT min	2178,46 ± 241,23	2000,01 ± 117,24	1463,84 ± 35,58	1951,57 ± 88,29
dP/dT max	2344,43 ± 180,50	2356,49 ± 56,53	1720,68 ± 34,46	2255,67 ± 99,87

FC= fréquence cardiaque ; PA= pression artérielle moyenne ; PDst= pression diastolique ; PDev= pression développée ; dP/dT min= dérivée première de la pression développée.

§ p=, IM Bas-Se vs SHAM Haut-Se, Mann & Whitney.

5.3.3. Étude de la compliance passive *ex-vivo*

La figure 17 illustre l'effet du sélénium sur l'évolution de la pression ventriculaire gauche en fonction du volume de la solution physiologique perfusée dans la cavité ventriculaire gauche de façon passive *ex-vivo*. Ces courbes pression-volume déterminent les propriétés mécaniques du tissu myocardique durant une diastole.

L'IDM induit un décalage significatif des courbes pression-volume vers la droite. Pour le groupe IM Bas-Se, ce décalage est d'autant plus marqué vers la droite par rapport à celui du groupe IM High-Se ($p < 0,05$).

De même, l'IDM affecte de façon significative le volume résiduel télédiastolique (tableau 20). L'augmentation du volume résiduel télédiastolique observé dans le lot d'animaux à faible statut en sélénium tend à être moindre dans le groupe Haut-Se.

Les constantes de rigidité de la paroi libre du ventricule gauche (k_1 , k_2 et k_3) ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes ligaturés (tableau 20).

L'étude des courbes pression-volume passives montre une altération de la fonction diastolique chez les groupes infarcis. Cette altération qui se traduit par une augmentation du

volume de la cavité ventriculaire gauche et une détérioration de sa compliance est moindre chez les animaux ayant un statut élevé en sélénium.

L'ensemble de ces données suggère que le sélénium freine l'altération de la compliance ventriculaire passive induite par l'IDM.

5.3.4. Analyse *post-mortem* de la géométrie cardiaque

Les analyses *post-mortem* de la taille d'infarctus et de la géométrie cardiaque sont résumées respectivement par la figure 18 et le tableau 21.

La ligature de l'ACG entraîne la nécrose de près de la moitié du ventricule gauche (50 %) dans le groupe Bas-Se à 8 jours de reperfusion (figure 15). La perte cellulaire consécutive à l'ischémie/reperfusion affecte seulement 38% de la masse ventriculaire gauche dans le groupe Haut-Se. Cette différence de taille d'infarctus est statistiquement significative entre les deux groupes.

Aucune différence d'épaisseur du septum et du ventricule droit entre les 4 groupes étudiés n'est observée ($p=0,35$). En revanche, l'épaisseur minimale de la paroi libre du ventricule gauche est significativement diminuée chez les rats ligaturés par rapport aux groupes « SHAM » ($p<0,05$), avec un amincissement plus prononcé de cette paroi pour le groupe « Bas-Se ».

Ainsi, l'indice de rétrécissement des parois ventriculaires cardiaques est significativement affecté dans le groupe « Bas-Se ». L'indice de dilatation des cavités reste comparable entre les deux groupes ligaturés. En conséquence, les deux groupes présentent un indice d'expansion de l'infarctus significativement différent ($p<0,05$).

Nos résultats montrent qu'un statut élevé en sélénium est associé à une limitation des altérations de la morphologie du myocarde ischémique à 8 jours post-infarctus.

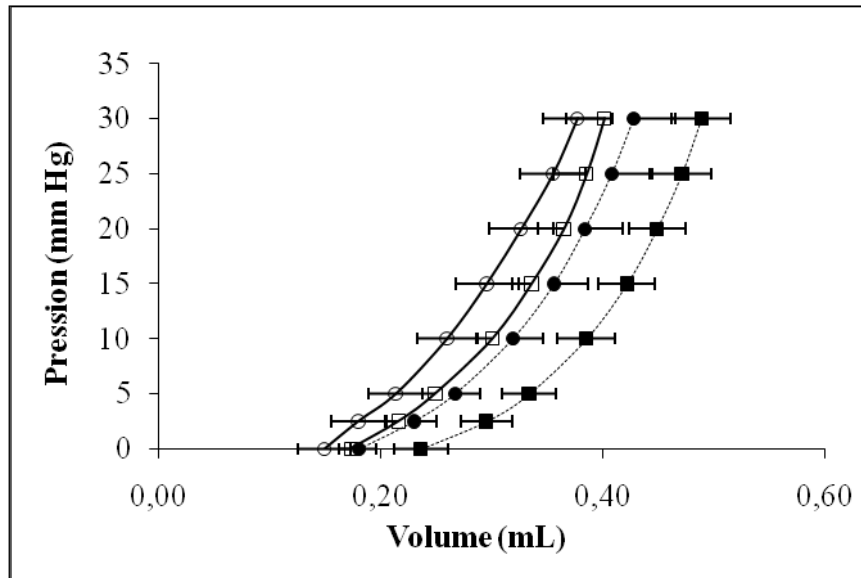


Figure 16: Évolution de la pression ventriculaire gauche en fonction du volume de solution physiologique perfusée dans la cavité ventriculaire gauche de façon passive *ex-vivo*.

Les groupes sont définis dans les groupes expérimentaux. Les ronds correspondent aux groupes « Haut-Se » et carrés aux groupes « Bas-Se ». les caractères ouverts représentent les « SHAM » tandis que ceux fermés les « IM ».

* $p < 0,05$, vs « Haut-Se » et « SHAM Bas-Se »

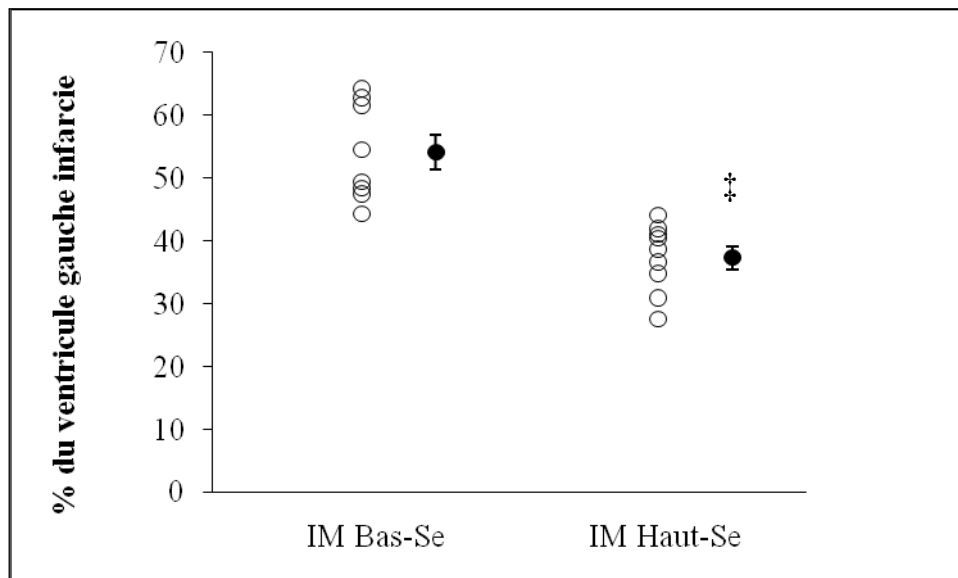


Figure 17 : Évaluation du pourcentage de nécrose après 1 heure d'occlusion de l'artère coronaire gauche suivie de 8 jours de reperfusion.

‡ $p < 0,05$, vs « IM Bas-Se ».

Tableau 20 : Effet du sélénium sur les constantes de rigidité du ventricule gauche et le volume résiduel télédiastolique intracavitaire gauche mesurés 8 jours après la reperfusion post-infarctus.

	Groupes expérimentaux			
	SHAM-Bas-Se (n=7)	SHAM-Haut-Se (11)	MI-Bas-Se (n=7)	MI-Haut-Se (n=11)
VDst (mL)	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,21 ± 0,02*	0,17 ± 0,02
k1	63,57 ± 5,93	67,33 ± 2,94	50,80 ± 6,20	56,97 ± 5,07
k2	18,82 ± 2,39	20,55 ± 1,06	16,69 ± 1,62	16,80 ± 1,24
k3	11,57 ± 0,94	11,86 ± 0,74	11,24 ± 0,82	10,71 ± 1,12

* p=0,016 vs SHAM-Bas-Se ; k1-3= constantes; VDst= volume résiduel télédiastolique.

Tableau 21 : Effet du sélénium sur les indices morphométriques cardiaques mesurés 8 jours après la reperfusion post-infarctus.

	Groupes expérimentaux			
	SHAM-Bas-Se	SHAM-Haut-Se	IM-Bas-Se	IM-Haut-Se
ES (mm)	1,30 ± 0,07	1,58 ± 0,10	1,45 ± 0,13	1,34 ± 0,08
EVG (mm)	1,48 ± 0,09	1,63 ± 0,06	0,50 ± 0,07*‡	0,92 ± 0,10
EVD (mm)	0,58 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,66 ± 0,10	0,60 ± 0,04
ID	0,83 ± 0,02	0,84 ± 0,02	0,88 ± 0,02	0,89 ± 0,03
IR	1,48 ± 0,08	1,06 ± 0,05	0,35 ± 0,05*‡	0,70 ± 0,09*
IE	0,75 ± 0,05	0,80 ± 0,03	2,84 ± 0,43*‡	1,43 ± 0,22*

ES= épaisseur moyenne du septum; EVG= épaisseur moyenne de la paroi libre ventriculaire gauche; EVD= épaisseur moyenne de la paroi libre du ventricule droit; ID= indice de dilatation; IR= indice de rétrécissement; IE= indice d'expansion.

*p<0,05 vs SHAM; ‡ p<0,05 vs IM-Haut-Se.

5.4. Conclusion

Dans notre modèle expérimental, l'occlusion de l'ACG (60 min) provoque des AVM responsables de près de 50% de la mortalité des animaux ligaturés durant les 15 premières min de l'ischémie. Une élévation du statut en sélénium semble diminuer le risque de mortalité liée aux AVM observées. Parallèlement, notre modèle d'ischémie/reperfusion induit un IDM majeur (50% de la masse ventriculaire gauche) à 8 jours post-reperfusion que le prétraitement en sélénium modère significativement. Les modifications de la géométrie cardiaque consécutives à l'IDM se caractérisent par l'augmentation de l'IE et se traduisent par l'altération des propriétés mécaniques du tissu ventriculaire. Ces transformations s'accompagnent d'une dysfonction diastolique qui se révèle uniquement en condition mimant un stress comme l'hypervolémie. A l'exception de la dysfonction diastolique, la supplémentation chronique en sélénium provoque une nette diminution de ces altérations.

En résumé, nos résultats montrent que le sélénium peut réduire significativement les conséquences des AVM ischémiques *in-vivo*. L'ensemble de ces observations confirme également que les modifications histologiques consécutives à l'IDM altèrent les mécanismes de relaxation cardiaque dans notre modèle expérimental et induisent une dysfonction diastolique. Le statut en sélénium influence positivement et de façon significative la taille de l'infarctus ainsi que les propriétés mécaniques de la paroi ventriculaire gauche étudiées *ex-vivo* sans toutefois influencer sur la fonction diastolique *in situ*.

6. SUPPLEMENTATION EN SELENIUM ET REACTIVITE VASCULAIRE POST-INFARCTUS

6.1. Introduction

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les lésions consécutives à l'ischémie/reperfusion ne se limitent pas au tissu cardiaque mais s'étendent également aux cellules vasculaires et, plus particulièrement, à l'endothélium coronaire (Rubanyi et coll. 1988; Marin et Rodriguez-Martinez 1995; Conger et Weil 1995) avec pour principale conséquence l'altération de la réactivité vasculaire (Ku 1982).

A ce stade de notre travail, nous avons obtenu différents résultats qui viennent confirmer le rôle du sélénium dans la limitation du syndrome de reperfusion du myocarde ischémique et des altérations du remodelage cardiaque (Tanguy et coll. 2004 ; chapitre I, partie 5 du chapitre II). Dans la partie qui suit, nous avons étudié l'effet du sélénium sur la réactivité vasculaire de l'aorte thoracique dans la phase aigüe du post-infarctus et, plus particulièrement, sur l'intégrité endothéliale. Le choix du type de tissu vasculaire est fondé sur l'importance du rôle de l'aorte thoracique dans la régulation de la pression artérielle et sa facilité d'accès.

Tout d'abord, nous avons évalué les conséquences d'un processus d'IDM sévère (50% de nécrose) sur l'intégrité vasculaire, et notamment sur la capacité de l'endothélium à générer le NO à 8 jours post-reperfusion. Ensuite, nous avons évalué les effets d'une élévation du statut plasmatique en sélénium sur ces paramètres.

6.2. Méthodes

Le modèle expérimental utilisé est celui des anneaux d'aorte isolés. Ce protocole fait suite à celui de la partie 5 de ce chapitre dont le schéma du protocole ainsi que les groupes expérimentaux sont décrits dans la partie 3.

Le cœur de l'animal est prélevé après son arrêt au KCl saturé. L'aorte thoracique est alors rapidement isolée puis placée dans la solution physiologique de type Krebs-Henseleit dont la composition est la suivante : NaCl 118,50 mM ; NaHCO₃ 25,00 mM ; KCl 4,75 mM ;

MgSO₄·7H₂O 1,19 mM ; CaCl₂·2H₂O 1,36 mM ; KH₂PO₄ 1,18 mM ; glucose 11,10 mM, pH = 7,4 à 0 °C. Une fois rincée et nettoyée de tout tissu conjonctif et adipeux, l'aorte est délicatement sectionnée de façon transversale en anneaux d'environ 1 mm d'épaisseur. Chaque anneau est placé entre deux crochets parallèles dans une cuve à organe isolé thermostatée à 37 °C et remplie du liquide physiologique recevant constamment un mélange gazeux (O₂ 95 % et CO₂ 5 %) (Figure 16). L'un des crochets métalliques est fixé à la base de la cuve et l'autre est relié à un transducteur isométrique (Harvard Apparatus), lui-même relié à un amplificateur (Hugo Sachs Electronic, Germany). Ce dernier est connecté à un système d'acquisition informatique MacLab relié à un ordinateur MacIntosh (MacLab AD Instruments ; MacIntosh classique, Castle Hill, Australie).

Stabilisation

L'anneau est tendu une première fois à 2g, puis laissé se stabiliser durant 60 min. La solution de Krebs-Henseleit est changée toutes les 15 min et l'anneau tendu une deuxième fois après 30 min de stabilisation.

Test d'intégrité

A la fin de la période de stabilisation, chaque anneau subit un test d'intégrité afin d'évaluer la qualité fonctionnelle de sa musculature et de son endothélium. Dans notre étude, l'intégrité du muscle lisse se traduit par sa capacité à se contracter en réponse à la phényléphrine (PHE) à 10⁻⁶ M (d'au moins 0,5g) et à se relâcher en réponse à l'ACH (d'au moins 50%) à 10⁻⁶ M. La relaxation rapide à l'ACH est due à une libération accrue de °NO par les CE, ce qui induit la relaxation des CML. Cette décontraction rapide constitue le critère d'intégrité de l'endothélium retenu dans notre protocole. L'anneau est ensuite rincé et stabilisé de nouveau pendant 15 minutes.

Contractilité vasculaire

Après la réalisation du test d'intégrité, la capacité maximale des anneaux d'aorte à se contracter est évaluée par l'ajout d'une solution de KCl (90 mM).

Ensuite, les relations effet-dose avec un agent contracteur (PHE= 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² M) et un agent dilatateur (ACH= 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ M) sont étudiées.

Pour finir, la capacité des CML vasculaires à se relaxer indépendamment de l'état de l'endothélium est évaluée par l'ajout successif d'un donneur de °NO, le nitroprussiate de sodium (SNP), à différentes concentrations (10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M). Pour l'établissement

des courbes effet-dose de l'ACH et du SNP, les anneaux d'aorte ont été préalablement contractés par la PHE à 10^{-6} M.

Chaque test a été réalisé sur au moins 10 anneaux provenant de plusieurs rats. La réponse à la PHE est exprimée en g et celle aux agents vasorelaxants en pourcentage d'inhibition de la contraction à la PHE 10^{-6} M. Entre chaque test, les préparations aortiques sont rincées et stabilisées durant 15 min.

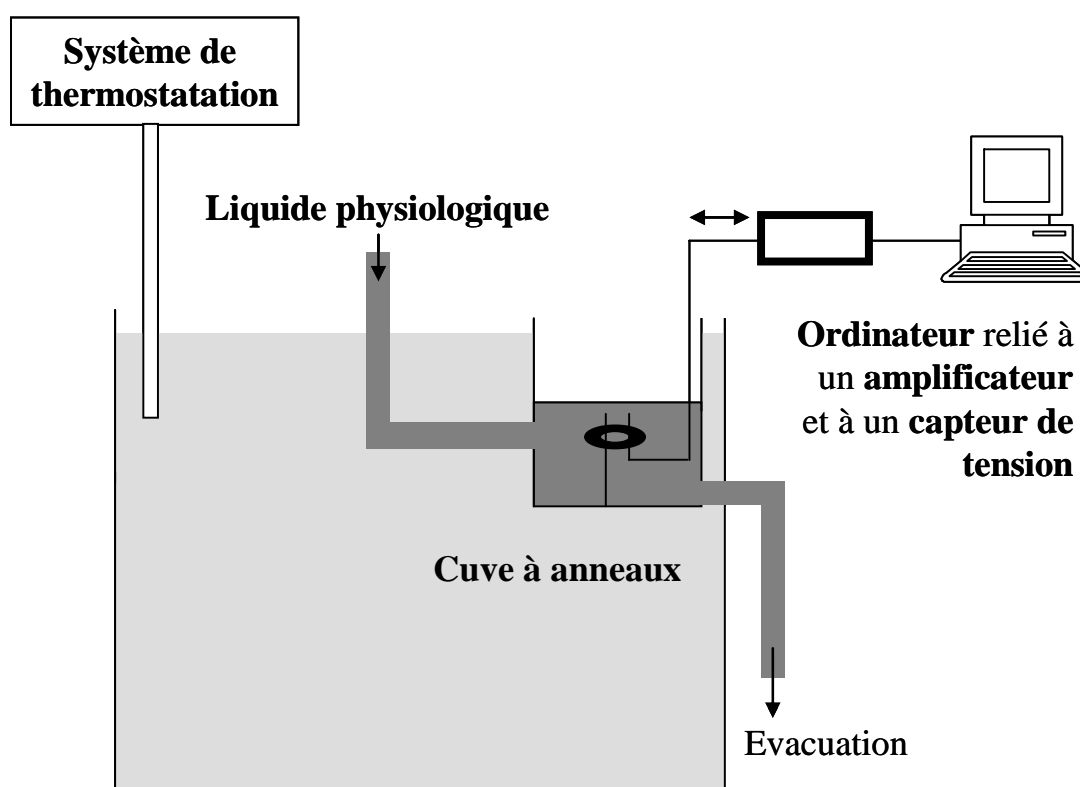


Figure 18 : Dispositif de mesure de contractilité vasculaire

6.3. Résultats

Le tableau 22 résume les effets de l'ischémie/reperfusion sur la réactivité vasculaire des anneaux d'aorte.

Tableau 22: Effet de l'infarctus du myocarde sur la réactivité vasculaire d'anneau d'aorte évaluée 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

	Groupes expérimentaux			
	SHAM-Bas-Se (n=31)	SHAM-Haut-Se (n=36)	IM-Bas-Se (n=22)	IM-Haut-Se (n=)
PHE				
<i>E_{max}</i> (g)	1,84 ± 0,12	1,79 ± 0,13	2,24 ± 0,12	1,60 ± 0,10
ACH				
<i>E_{max}</i> (%)	77,52 ± 3,25	90,71 ± 1,57‡*	84,89 ± 1,85	90,39 ± 2,57‡*
<i>pD2</i>	6,84 ± 0,05	7,07 ± 0,04‡*	6,86 ± 0,07	7,11 ± 0,05‡*
SNP				
<i>E_{max}</i> (%)	98,93 ± 0,93	100,97 ± 0,78	95,20 ± 1,27	101,26 ± 0,37
<i>pD2</i>	7,82 ± 0,12	7,77 ± 0,54	7,95 ± 0,14	8,02 ± 0,08

% = pourcentage d'inhibition de la contraction au PHE ; g= gramme ; E_{max}= effet maximal ; pD₂= point d'inflexion de la courbe effet-dose.

*p<0,01 vs « IM Bas-Se » ; ‡p<0,01 vs « SHAM Bas-Se »

6.3.1. Effet du sélénium sur la réponse vasculaire au chlorure de potassium

Les tensions maximales (en g) atteintes à l'ajout d'une dose unique de KCl (90 mM) sont respectivement: SHAM-Bas-Se=1,93 ± 0,09 ; SHAM-Haut-Se= 2,01 ± 0,08; IM-Bas-Se = 1,61 ± 0,14; IM-Haut-Se =1,64 ± 0,10. Cette capacité des CML vasculaires aortiques à se contracter de façon passive est abaissée significativement par l'ischémie/reperfusion quel que soit le statut en sélénium (p<0,05).

Ce résultat suggère que l'ischémie/reperfusion modifie les propriétés contractiles des CML vasculaires et que le prétraitement au sélénium n'a pas d'impact sur cet effet.

6.3.2. Effet du sélénium sur la contraction vasculaire induite par la phényléphrine

Les courbes dose-réponse à la PHE sont représentées par la figure 19. Dans les groupes « Bas-Se », on observe une contraction plus importante des CML en réponse à la PHE chez les ligaturés (IM) par rapport à leur contrôle (SHAM). Cette différence de réponse est toutefois non significative. Quand on compare les deux groupes ligaturés, on observe également une contraction plus importante des anneaux d'aorte dans le groupe « IM Bas-Se » par rapport au groupe « IM Haut-Se ». Là encore, la différence n'est pas significative.

Dans nos conditions expérimentales, un statut faible en sélénium tend à potentialiser la vasoréactivité des CML vasculaires aortiques après un IDM.

6.3.3. Effet du sélénium sur la relaxation vasculaire induite par l'acétylcholine

La tension obtenue en réponse à la PHE (10^{-6} M) est statistiquement équivalente entre les différents groupes. L'addition de la gamme d'ACH (10^{-9} - 10^{-4} M) entraîne une relaxation dose-dépendante des anneaux d'aorte (figure 20) qui est dépendante de l'endothélium.

L'IDM ne modifie pas l'allure des courbes effet-dose ainsi obtenues. En comparant les courbes effet-dose de chaque groupe « IM », avec son « SHAM » respectif, aucune différence n'est observée.

Cependant, la relaxation dose-dépendante à l'ACH est plus importante pour les groupes « Haut-Se » par rapport aux groupes « Bas-Se ». Cette différence est significative.

Dans nos conditions expérimentales, l'ischémie (60 min) suivie de 8 jours de reperfusion ne semble pas altérer la capacité de la paroi vasculaire à produire du NO ou à réagir au NO . En revanche, un régime appauvri en sélénium est associé à une altération de la relaxation endothélium-dépendante.

6.3.4. Effet du sélénium sur la relaxation au nitroprussiate de sodium

Comme le montre la figure 21, la relaxation dose-dépendante au SNP (10^{-9} - 10^{-4} M) est identique pour tous les anneaux de tous les groupes. Cette similitude de réponse au donneur de NO traduit une intégrité intacte des CML vasculaires des différents groupes.

L'ischémie/reperfusion ainsi que la supplémentation en sélénium n'ont aucun effet sur la capacité de relaxation des CML vasculaires.

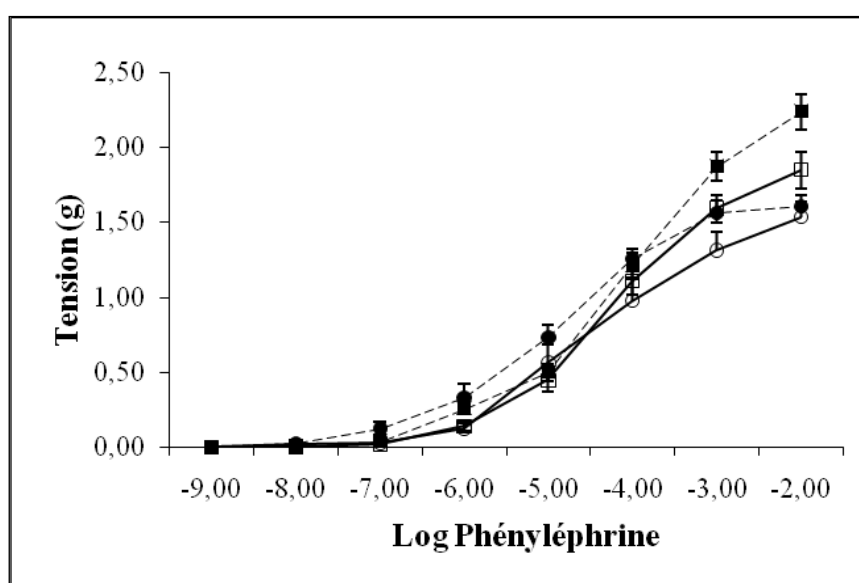


Figure 19 : Courbes effet-dose des anneaux d'aorte en réponse au phényléphrine.

Les groupes sont définis dans les groupes expérimentaux. Les ronds correspondent aux groupes « Haut-Se » et carrés aux groupes « Bas-Se ». les caractères ouverts représentent les « SHAM » tandis que ceux fermés les « IM ».

6.4. Conclusion

Le présent travail a été réalisé dans le but de valoriser les propriétés nutritionnelles du sélénium, en étudiant l'effet de son administration chronique sur la réactivité vasculaire en conditions normales et en conditions pathologiques chez le rat.

Les résultats obtenus montrent que les réponses des anneaux d'aorte aux différentes substances pharmacologiques vasoactives utilisées dans cette étude étaient similaires dans les

groupes ligaturés en comparaison avec leurs contrôles respectifs. Toutefois, en comparant les réponses vasomotrices des anneaux d'aorte isolés selon les statuts en sélénium, on remarque une différence de réactivité en faveur d'un affaiblissement de la relaxation dépendante de l'endothélium et d'une amplification de la contraction vasculaire dans le groupe ayant reçu un régime alimentaire pauvre en sélénium. Contrairement aux observations faites sur la relaxation endothélium-dépendante dans des situations pathologiques comme l'hypertension artérielle ou les diabètes (Lüscher 1992; Cohen 1993), nous avons remarqué une amplification de la relaxation endothélium-dépendante en réponse à l'ACH des anneaux d'aorte issus des animaux à statut élevé en sélénium. Cet effet est également observé après IDM.

En contraste avec l'hypothèse d'une altération de la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium par l'ischémie/reperfusion (Lefer et coll. 1991), l'ensemble de ces données indique que, dans nos conditions expérimentales, l'IDM n'entraîne pas d'effet sur la fonction contractile vasculaire aortique à 8 jours post-reperfusion. Ces résultats mettent en évidence une absence d'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium par l'ischémie/reperfusion. En outre, le test de contractilité au SNP montre que le muscle lisse vasculaire conserve intacte sa capacité à se relâcher. Nos résultats confirment donc les observations de Quillen et coll. (1990) montrant que l'ischémie/reperfusion n'affecte pas les artères de gros diamètre telles que l'aorte. D'autre part, ces résultats confortent l'hypothèse de Lu et coll. (1994) en démontrant que le sélénium potentialise la relaxation vasculaire médiée par la monocouche endothéliale chez le rat.

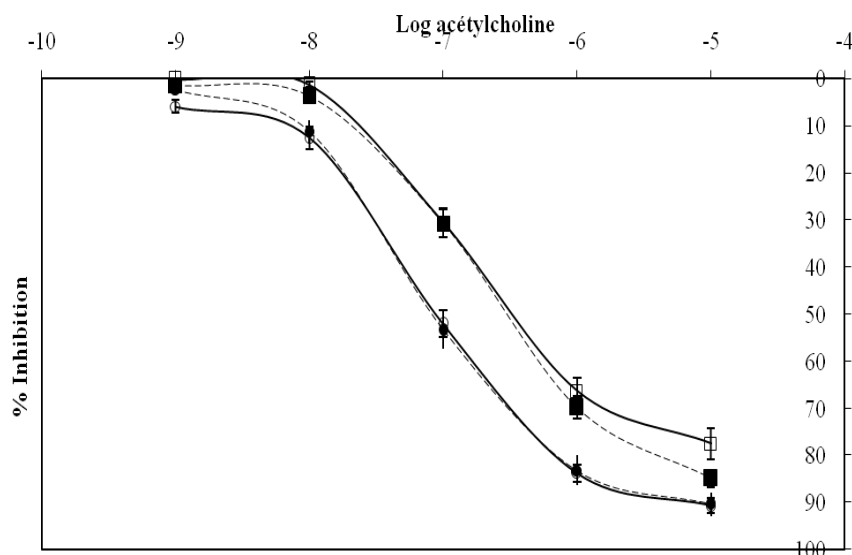


Figure 20 : Courbes effet-dose des anneaux d'aorte isolée en réponse à l'acétylcholine.

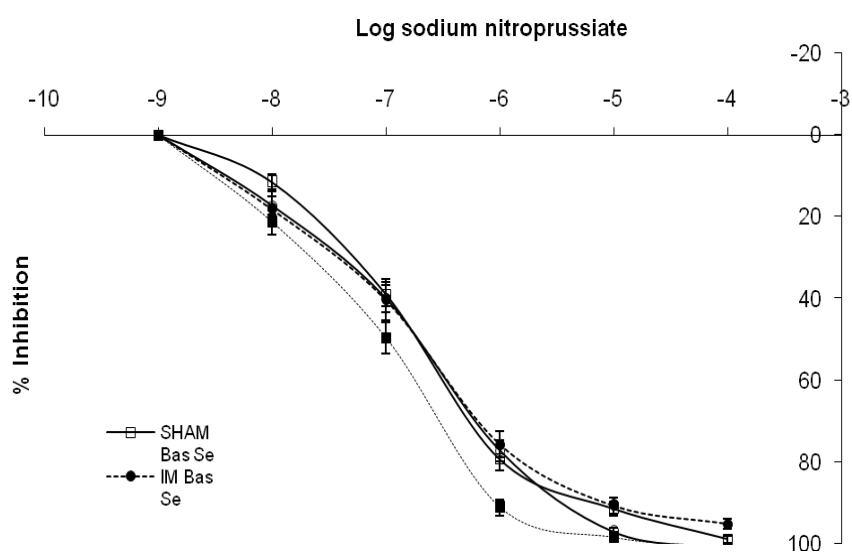


Figure 21 : Courbes effet-dose des anneaux d'aorte en réponse au sodium nitroprussiate.

Les groupes sont définis dans les groupes expérimentaux. Les ronds correspondent aux groupes « Haut-Se » et carrés aux groupes « Bas-Se ». les caractères ouverts représentent les « SHAM » tandis que ceux fermés les « IM ».

7. DISCUSSION

En accord avec les études expérimentales antérieures qui ont montré qu'un apport quotidien élevé en sélénium a des effets cardioprotecteurs dans des situations d'ischémie/reperfusion, ce chapitre de notre travail montre qu'une élévation du statut en sélénium préalablement à l'induction de l'IDM diminue la taille de l'infarctus mesurée à 8 jours post-reperfusion. Singulièrement, la mortalité liée aux AVM ayant lieu au cours de l'ischémie myocardique est diminuée par la supplémentation en sélénium. De plus, le remodelage cardiaque est amélioré. En revanche, pas d'effet notable de cette approche nutritionnelle n'a pu être mis en évidence sur les indices de la fonction cardiaque et plus particulièrement de la fonction diastolique.

En accord avec les résultats obtenus par Lu et coll. (1984), l'évaluation de la réactivité vasculaire *ex-vivo* après 8 jours de reperfusion post-ischémique montre que le sélénium potentialise la relaxation endothélium-dépendante de l'aorte induite par l'ACH.

7.1. Conséquences morphologiques et fonctionnelles cardiaques

Le modèle expérimental d'ischémie/reperfusion par ligature transitoire de l'artère coronaire gauche chez le rat est régulièrement utilisé pour étudier le remodelage cardiaque post-infarctus et la dysfonction ventriculaire qui en résulte. Ce modèle, tel que décrit originellement par Fabiani et coll. (1977) est connu pour induire un IDM supérieur à 40% de la masse ventriculaire gauche conduisant au développement d'une dysfonction contractile cardiaque précoce, accompagnée d'une altération de la morphologie cardiaque dès 8 jours post-reperfusion (Moro et coll. 2007).

La différence de taille de l'IDM (~20%), exprimée en pourcentage du VG, entre les deux statuts en sélénium pourrait être interprétée de deux manières : la diminution de la taille de l'infarctus est causée par un statut élevé en sélénium ou à l'inverse, l'affaiblissement du statut en sélénium conduit à une augmentation de la taille de nécrose. En conséquence, il est difficile d'affirmer lequel de l'affaiblissement ou du renforcement du statut en sélénium est à l'origine de cette différence. Toutefois, nos résultats suggèrent que la taille de l'infarctus est associée à la teneur plasmatique en sélénium. Dans ce cas, il serait important d'étudier la relation dose-effet et de déterminer le statut en sélénium après un IDM. Ce point est traité dans le chapitre IV.

En contraste avec les résultats de Moro et coll. (2007), la dysfonction contractile cardiaque observée durant la première semaine post-infarctus n'apparaît que dans des conditions mimant une élévation de post-charge (surcharge volumique). Ces résultats pourraient s'expliquer du fait qu'à 1 semaine post-infarctus, des mécanismes de compensation ont été mis en jeu afin de maintenir une fonction d'éjection suffisante. C'est le cas par exemple de l'activation des systèmes neuro-hormonaux tels que le système catécholaminergique et le système rénine-angiotensine-aldostérone, qui a été mise en évidence Silvestre et coll. en 1999. L'importance de l'activation du système rénine-angiotensine après un IDM est maintenant bien établie (Wollert et coll. 1994). Bien que nous ne l'ayons pas évalué en mesurant la production d'Ang II, ce système joue un rôle central dans le contrôle du tonus vasculaire et de la pression artérielle, du tonus du système nerveux sympathique, ainsi que des fonctions cardiaques et rénales. De plus, l'Ang II favorise la formation de la matrice extracellulaire. Dans ce cas, l'absence d'effet du sélénium sur la fonction cardiaque pourrait s'expliquer par le fait qu'initialement, on n'observe pas de différence. D'ailleurs, l'élévation de la pression télédiastolique précoce observée dans nos groupes expérimentaux participe aux phénomènes compensateurs qui permettent de normaliser le volume d'éjection systolique par un mécanisme de Frank-Starling.

Différents mécanismes sont activés effectivement au cours de la phase précoce du post-infarctus. Tout d'abord, la dilatation de la cavité ventriculaire gauche a lieu pour compenser la baisse de la fraction d'éjection systolique. En conséquence de l'augmentation des tensions pariétales, cette dilatation entraîne par la suite l'amincissement de la paroi infarctée, puis l'élargissement de la cavité ventriculaire gauche (Pfeffer et coll. 1987). L'ensemble de ces modifications est caractérisé par l'augmentation de l'indice d'expansion de l'infarctus, l'augmentation du volume résiduel télédiastolique, ainsi que le décalage vers la droite de la courbe pression-volume traduisant une altération de la compliance passive *ex-vivo*.

Les principaux résultats de l'évaluation du remodelage cardiaque à une semaine post-infarctus après supplémentation chronique en sélénium montrent une amélioration très significative de l'indice d'expansion traduisant un moindre amincissement ventriculaire gauche. En conséquence, celui-ci s'avère responsable, au moins en partie, de la limitation de la dilatation ventriculaire gauche (tableau 21), facteur prédictif de la mortalité post-infarctus (White et coll. 1987). Ces modifications se traduisent alors par un tissu cardiaque moins compliant comme le confirme le retardement du déplacement vers la droite de cette courbe que l'IDM induit. Les constantes k1-k3 étant statistiquement identiques entre les groupes, la

différence de compliance serait expliquée par un plus grand volume mort des cœurs infarctés Bas-Se (figure 16), et donc une dilatation plus forte. Suivant l'hypothèse de Rubin et coll. (1983), cette dilatation n'entraîne pas d'hypertrophie compensatrice des zones non infarctées en dessous de 15 jours.

Ce modèle est également connu pour induire des FV sévères durant les 60 minutes d'ischémie transitoire (Clements-Jewery et coll. 2005). Ces arythmies sont généralement réversibles par réversion mécanique (Clements-Jewery et coll. 2005). Cependant, nos résultats montrent que la fréquence des AVM et précisément la mortalité qui leur est liée sont sensiblement augmentées par un statut bas en sélénium malgré la réversion mécanique. Chez l'homme, ces AVM ont été suggérées comme susceptibles d'être la principale cause de mortalité due au à l'arrêt cardiaque subite après des épisodes de reperfusion post-ischémique. Nous avons observés que la sévérité de ces arythmies est corélée à l'élévation du statut en sélénium (200%) corroborant les résultats obtenus *ex-vivo* (Tanguy et coll. 1998 ; chapitre I). L'ensemble de ces données suggèrent donc que le renforcement du statut en sélénium limite l'apparition d'AVM post-ischémique. Toutefois, à ce niveau, il est difficile de spécifier exactement les différents types d'arythmies. Des études électrophysiologiques plus complètes permettraient d'élucider les mécanismes cellulaires mis en jeu. Toutefois, l'implication des JCs de type gap et plus particulièrement celles formées par les Cx43 est vraisemblablement. En effet, à travers ces structures, le flux ionique ainsi que les seconds messagers intracellulaires transitent rapidement d'une cellule à une autre coordonnant ainsi leur activité.

Bien que nous n'ayons pas mesuré directement la production d'ERO, la hausse du statut en sélénium se traduit par une augmentation de la capacité antioxydante tissulaire et plus particulièrement de l'aptitude du tissu cardiaque à détoxifier les hydroperoxydes (Venardos et coll. 2007). Et même si la supplémentation alimentaire en sélénium n'entraîne pas d'augmentation significative de l'activité GSH-Px, la principale enzyme détoxifiant les hydroperoxydes, l'implication du sélénium dans le contrôle du statut rédox tissulaire cardiaque a été récemment mise en évidence (Tanguy et coll. 2004 ; Venardos et coll. 2004). Un certain nombre de données démontrent l'implication des protéines sélénium-dépendantes telles que la GSH-Px et la TR dans le contrôle du statut rédox tissulaire (Brigelius-Flohe et coll. 2003 ; Venardos et coll. 2007 ; Papp et coll. 2007). D'un autre côté, il est également admis que la déplétion en sélénium entraîne une baisse à la fois de la teneur en GSH-Px et de son activité (Takahashi et coll. 1986). La production accrue en ERO et le stress oxydatif qui en résulte contribuent à l'IDM dans le cœur ischémie/reperfusé. En conséquence,

l'affaiblissement du statut en sélénium pourrait compliquer le remodelage pathologique ventriculaire.

Pour la première fois, l'étude des propriétés nutritionnelles du sélénium dans le devenir de l'IDM démontre clairement que le sélénium pris en prétraitement améliore l'évolution de l'IDM *in-vivo* dans sa phase précoce. Inversement, l'affaiblissement du statut en sélénium préalablement à la survenue d'un IDM aggrave le processus de mort cellulaire et de modification géométrique cardiaque. La limitation de la taille de nécrose observée précocement dans le post-infarctus semble donc être due, au moins en partie, à la préservation du statut rédox cellulaire induite par une élévation significative du statut en sélénium en pré-infarctus. La préservation du statut rédox cellulaire cardiaque favoriserait le développement d'un remodelage ventriculaire précis en limitant principalement la mort cellulaire. En dehors de cela, une relation entre le sélénium et la voie de signalisation pro-apoptotique du TNF- α est à envisager. Il a été clairement démontré que le sélénium peut intervenir dans la régulation de la mort cellulaire en régulant négativement le NF- κ B (Flohe et coll. 1997; Santamaria et coll. 2005). Le rôle du sélénium dans ces différents mécanismes est étudié et discuté dans le chapitre suivant.

7.2. Conséquences fonctionnelles vasculaires

Il a été démontré que dans les situations pathologiques dans lesquelles la relaxation endothélium-dépendante est altérée, les systèmes générateurs de superoxyde sont fréquemment activés. Il a été également démontré que l'administration d'antioxydants peut contrebalancer ce dysfonctionnement (Levine et coll. 1996). Dans ce contexte, il est admis que l'ischémie/reperfusion myocardique entraîne une altération de la réactivité vasculaire coronaire se manifestant par une baisse de la relaxation NO dépendante et une amplification de la contraction vasculaire aux molécules vasoactives (Lefer et coll. 1990).

En contraste avec cette hypothèse, nos résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, l'IDM n'entraîne pas d'effet sur la fonction contractile vasculaire aortique à 8 jours post-reperfusion. L'absence d'effet de l'IDM dans la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium est matière à spéculation. Les résultats contradictoires obtenus sont probablement liés à des différences dans la fonction et la structure des artères coronaires et de l'aorte qui ont été bien documentées (Furchgott et Vanhoutte 1989). Expérimentalement, les dysfonctions endothéliales ont été mises en évidence principalement au niveau des artères coronaires (Ku 1982; Pearson et coll. 1990). Cette altération de la fonction vasomotrice

coronaire est caractérisée par une réduction de la relaxation endothélium-dépendante des artères coronaires (Pearson et coll. 1990) et une potentialisation de la réponse vasoconstrictive (Ku 1982) qui n'apparaît qu'au moment de la reperfusion (Lefer et coll. 1991). Du fait de sa structure élastique, l'aorte, composée majoritairement de fibres élastiques, serait moins sensible aux agents vasomoteurs, du moins dans sa partie supérieure.

L'analyse de la contractilité vasculaire réalisée à 8 jours post-infarctus montre une hyperréactivité des vaisseaux ayant un statut bas en sélénium en réponse à un agent vasoconstricteur. Cet effet, certes mineur, pourrait découler de l'altération de la fonction endothéliale. En effet, la réponse vasculaire au donneur de NO , le SNP, n'a pas été modifiée. L'amplification de la relaxation vasculaire endothélium-dépendante induite par le sélénium dans des conditions normales comme dans une situation d'ischémie/reperfusion, suggère que : (i)- le statut en sélénium pourrait constituer un risque de modification chronique du tonus vasculaire dans des situations de stress oxydant telles que l'IDM ; (ii)- et que le prétraitement par un régime enrichi en cet élément limiterait l'hyperréactivité vasculaire accompagnant les MCV, dont les maladies coronaires.

Deux mécanismes peuvent être évoqués pour expliquer cet effet du sélénium : (i) soit le sélénium favoriserait la biodisponibilité du NO (ii) soit le sélénium augmenterait la sensibilité des CML. Cette dernière hypothèse peut être écartée du fait de l'absence d'effet d'une part, sur la réponse dose dépendante au SNP, et de l'autre, sur l'altération de la contraction maximale au KCl induite par l'IDM. Le mécanisme par lequel le sélénium favoriserait l'accroissement de la biodisponibilité du NO serait médié par des modifications cellulaires autres qu'à travers l'activité antioxydante de la GSH-Px ou de l'action directe du sélénium (Lu et coll. 1994). Les résultats de certains auteurs ont suggéré que le radical superoxyde produit à la reperfusion serait impliqué dans l'altération de la contractilité vasculaire induite par l'ischémie/reperfusion (Tsao et coll. 1990). Cette dysfonction serait initiée par l'augmentation du superoxyde et accentuée par l'adhérence des polynucléaires neutrophiles ainsi que l'infiltration leucocytaire vers les lésions de reperfusion, ce qui expliquerait l'absence de dysfonction endothéliale au niveau du tronçon aortique.

8. CONCLUSION

Dans la prévention des conséquences de l'IDM, un apport nutritionnel et quotidien en sélénium semble donc efficace dans la limitation du remodelage pathologique du ventricule gauche et particulièrement dans celle des troubles graves du rythme post-infarctus menaçant le pronostic vital. Même si les observations chez l'animal ne peuvent être appliquées directement à l'homme, ces résultats aident à préciser les effets du sélénium et à comprendre les différents mécanismes mis en jeu dans les effets cardioprotecteurs que cet élément exerce. Ce dernier point constitue l'objet du chapitre suivant.

Chapitre III

Remodelage cardiaque post-ischémique
précoce : rôles des processus oxydatif et
inflammatoire et effet du sélénium

1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons évoqué dans le rappel bibliographique, l'ischémie myocardique et la reperfusion post-ischémique sont souvent associées à des effets délétères assez spécifiques. La réparation cardiaque post-infarctus est caractérisée par une réduction de l'épaisseur de la paroi infarctée et une dilatation ventriculaire qui peut aboutir à la rupture et à l'arrêt cardiaque. C'est un processus hautement complexe, impliquant divers facteurs de croissance et voies de signalisation inflammatoire, le remodelage de la matrice extracellulaire, la mort cellulaire et probablement le stress oxydant.

1.1. Processus inflammatoire post-infarctus et TNF- α

L'occlusion aiguë ou la constriction progressive de l'artère coronaire entraîne une altération des propriétés contractiles cardiaques consécutive à des modifications biochimiques et structurales du myocarde (Ono et coll. 1998; Bertonneche et coll. 2004). Les travaux de Moro et coll. (2007) ont démontré que cette dysfonction contractile cardiaque précoce est associée à une induction transitoire de l'expression myocardique de cytokines inflammatoires telles qu'IL6, IL1 β et TNF- α et de molécules chimioattractantes (CINC2 et CINC3) à 8 jours post-reperfusion. Ce phénomène témoignant d'un processus inflammatoire précoce (Nian et coll. 2004; Frangiogannis 2006) permettrait d'induire et d'étendre le remodelage à tout le myocarde (Irwin et coll. 1999). L'induction de ces cytokines induit en effet de profonds changements au niveau du myocarde incluant une apoptose, une hypertrophie myocytaire, une altération de la contractilité ainsi que la transduction du signal inflammatoire vers le tissu sain (Irwin et coll. 1999 ; Feldman et coll. 2000 ; Higuchi et coll. 2004). L'accumulation de ces données cliniques et expérimentales suggèrent une implication étroite du TNF- α dans ces altérations fonctionnelles et structurales précoces (Ono et coll. 1998; Bertonneche et coll. 2004; Higuchi et coll. 2004; Moro et coll. 2007).

1.2. Processus oxydatif et TNF- α dans le post-infarctus

L'implication du stress oxydant dans la pathogénèse de l'insuffisance cardiaque chronique, issue commune de la plupart des MCV d'origine ischémique, est généralement admise. L'augmentation de la production de radicaux libres et/ou l'affaiblissement de la

défense cellulaire antioxydante ont été largement discutés dans la littérature (Giordano, 2005 ; de Lorgeril et coll. 2006)

Depuis plus de 20 ans, un certain nombre d'études expérimentales a clairement démontré la corrélation entre le stress oxydant et la dysfonction cardiaque post-infarctus (pour revue, Giordano 2005). Les ERO peuvent directement influencer sur la fonction contractile cardiaque en modifiant non seulement la sensibilité de l'appareil contractile mais également la teneur cytoplasmique en calcium (pour revue, Zima et Blatter 2006). Indirectement, les modifications moléculaires des cellules cardiaques ainsi que les effets cytotoxiques causés par les radicaux libres et les ERO peuvent engendrer une dysfonction cellulaire (Giordano FJ 2005) et aboutir à terme à l'insuffisance cardiaque.

Par ailleurs, de nombreuses études suggèrent que les ERO et ERN joueraient un rôle de médiateurs dans la réponse adaptative du myocarde au stress ischémique aussi bien qu'au stress interne comme l'étirement chronique mécanique ou encore l'inflammation (Siwik et coll. 2001 ; Yamaguchi et coll. 2003). Dans le cadre du processus ischémique, ces molécules ont la capacité de stimuler le remodelage ventriculaire à travers l'activation de protéines clés du remodelage ventriculaire telles que les MMPs (matrix metalloproteinase protein) qui sont des effecteurs finaux de la fibrose et du remodelage de la matrice extracellulaire (Siwik et coll. 2001). Les ERO sont capables d'activer également NF-kB, AP-1(activator protein-1) ou encore ASK-1 (apoptose signaling kinase-1) dont l'inhibition a été associée à la réduction de la mort cellulaire et du remodelage ventriculaire chez la souris (Yamaguchi et coll. 2003), (Siwik et coll. 2001).

Si le stress oxydant, résultant de l'excès de production d'ERO/ERN ou d'une baisse des systèmes antioxydants cellulaires, et le TNF- α sont respectivement impliqués dans le remodelage ventriculaire et la dysfonction cardiaque post-infarctus, leur relation dans ces processus reste à établir. Les ERO sont connues pour augmenter l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Tolando et coll. 2000), alors que le TNF- α peut activer la production de radicaux libres. La réduction de l'infiltration leucocytaire et la diminution de la taille de l'infarctus par des stratégies utilisant des inhibiteurs de la LPO (dont l'activation accrue dans le myocarde ischémique est une source d'ERO) suggèrent l'existence d'un lien entre le stress oxydant et le processus inflammatoire post-ischémique dans les modifications fonctionnelles et structurales post-infarctus.

1.3. Connexine 43 et arythmies ventriculaires malignes

Dans le rappel bibliographique, nous avons vu que l'ischémie myocardique entraîne en une réduction du pH tissulaire, une augmentation des concentrations extracellulaire en K^+ et intracellulaire en Ca^{2+} et des modifications neurohormonales. L'ensemble de ces modifications contribue au développement d'une instabilité électrique pouvant mener aux AVM. Des études précédentes ont montré que les changements rapides de la phosphorylation de la Cx43 peuvent être modulés par le pH cellulaire et par l'ischémie myocardique (Beardslee et coll. 2000 ; Schulz et coll. 2007). Le premier chapitre de ce travail nous a permis d'illustrer l'implication du stress oxydant consécutif à l'ischémie et à la reperfusion dans ce processus de déphosphorylation. Nos résultats ont montré que l'amoinissement de la déphosphorylation des Cx43 myocardiques induite par l'ischémie/reperfusion a été associé à la limitation significative des FV générées par la reperfusion post-ischémique en termes de sévérité et de fréquence. Le lien entre la diminution de la mortalité due aux AVM et l'état de phosphorylation des Cx43 myocardique reste donc à vérifier *in-vivo*.

2. OBJECTIF DE L'ETUDE

Non exprimées constitutivement dans le myocarde, les cytokines inflammatoires sont induites lors de situations de stress telles que l'ischémie ou l'étirement mécanique du tissu myocardique via l'activation des facteurs de transcription NF-kB et AP-1 (Feldman et coll. 2000). Dans l'ischémie myocardique, elles sont libérées en quantité considérable en réponse à l'activation neurohormonale (Kalra et coll. 2002) et au stress oxydatif chronique (Keith et coll. 1998). L'augmentation de la capacité des systèmes antioxydants intrinsèques ou la réduction des sources d'ERO peuvent alors constituer une approche efficace dans le contrôle du remodelage ventriculaire post-infarctus.

Grâce à l'activation d'une multitude de protéines dont les sélénoprotéines TR et GSH-Px, le sélénium joue un rôle majeur dans les systèmes de défense contre le stress oxydant des tissus biologiques (Brigelius-Flohe et coll. 2003, Papp et coll. 2007). C'est la raison pour laquelle nous avons modulé le statut individuel en sélénium dans nos groupes expérimentaux. En plus, de ses capacités antioxydantes, le sélénium peut moduler les fonctions des cellules immunitaires et la production de cytokines. Cet élément trace peut intervenir dans la régulation de la mort cellulaire en régulant négativement le NF-kB, un élément clé de la voie

de signalisation intracellulaire conduisant à la libération de TNF- α . Nous nous sommes intéressés à la relation entre l'optimisation du statut rédox cellulaire et le processus inflammatoire observé à la phase aiguë du post-infarctus.

Le but de notre étude a donc été d'objectiver les mécanismes mis en jeu dans les effets cardioprotecteurs du sélénium mis en exergue précédemment. Nous avons évalué à la fois la capacité antioxydante cellulaire et le niveau d'expression de la principale cytokine inflammatoire qu'est le TNF- α . En outre, cette étude nous a permis d'évaluer, la relation entre les AVM observés *in-vivo* et le niveau de déphosphorylation de la Cx43. La mortalité ischémique liée aux AVM étant diminuée par le sélénium, il nous a donc semblé important de vérifier, le niveau de déphosphorylation myocardique de la Cx43.

3. METHODES

Les animaux ont été soumis au protocole d'infarctus expérimental (60 min d'IR suivie de 8 jours de reperfusion) décrit dans le chapitre II. Les groupes étudiés étaient les suivants:

- SHAM Bas-Se: groupe contrôle nourris au régime pauvre en sélénium;
- IM Bas-Se: groupe recevant le même régime et soumis au protocole d'IR;
- SHAM Haut-Se: groupe contrôle nourris au régime enrichi en sélénium ;
- IM Haut-Se: groupe recevant le même régime et soumis au protocole d'IR.

3.1. Activité des enzymes antioxydantes

Les dosages des concentrations tissulaires de SOD, de catalase, de GSH-Px ainsi que de TR ont été réalisés comme décrit dans les *Méthodes générales*.

3.2. Niveau d'expression et de déphosphorylation de la Cx43

La teneur myocardique totale en Cx43 ainsi que la teneur en Cx43 non phosphorylés ont été quantifiée par la technique de WI comme décrit dans les *Méthodes Générales*.

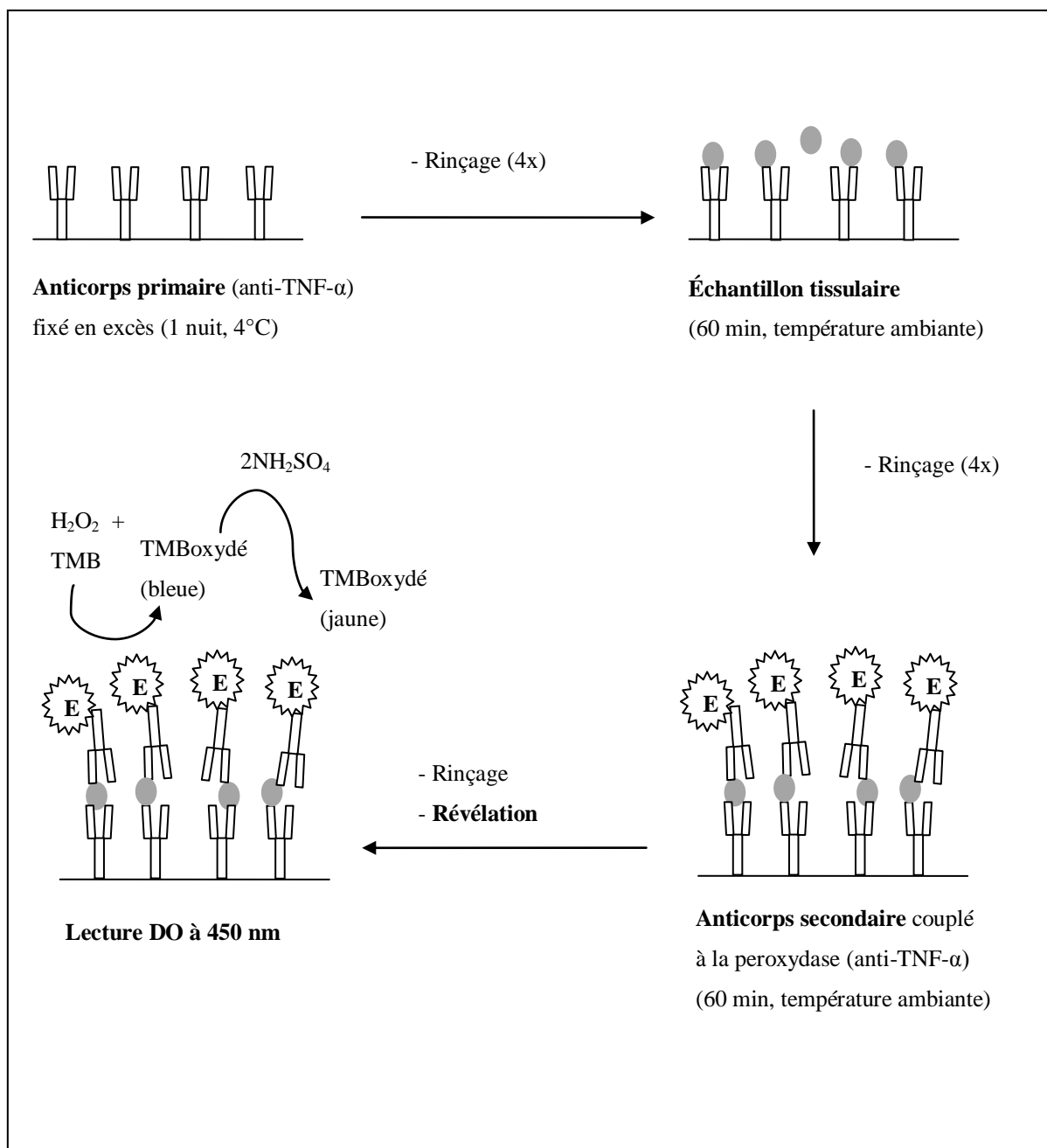


Figure 22 : Protocole ELISA Sandwich

TMB= tetraméthylbenzidine ; TMBoxydé= tetraméthylbenzidine oxydé ; H_2O_2 = peroxyde d'hydrogène ; E= enzyme, TNF- α = tumor nécrosifactor alpha ; DO= densité optique.

3.3. Niveau d'expression du TNF- α

La teneur myocardique de la protéine TNF- α a été quantifiée par la technique immunoenzymologique ELISA de type "Sandwich" (figure 22). Pour ce dosage, le kit (kit Rat-TNF- α DY510, R&D Systems, Grande-Bretagne) a été utilisé.

Le TNF- α contenu dans les échantillons tissulaires a été immobilisé par l'intermédiaire d'un anticorps dit de capture (monoclonal de souris anti-TNF- α de rat dilué au 1/180), préalablement fixé sur le fond de la plaque de dosage. Le TNF- α est par la suite reconnu par un anticorps secondaire (polyclonal de chèvre anti TNF- α de rat) couplé à une enzyme (peroxydase). L'ensemble est révélé en ajoutant un substrat de l'enzyme (peroxyde d'hydrogène) et un chromogène (*DY999*) dont le produit de réaction bleu (peroxyde de tetraméthylbenzidine) vire au jaune en milieu acide ($2\text{NH}_2\text{SO}_4$, *DY994*). L'intensité de cette coloration jaune a été suivie à 450 nm (Titertek Multiskan Plus, MK II, Labsystems). Elle est directement proportionnelle à la quantité de TNF- α présent. Les concentrations finales en TNF- α , exprimées en pg/mg de protéines, ont été obtenues à partir d'une courbe standard de TNF- α (0 à 2000 pg/mL).

4. RESULTATS

Les différents dosages ont été réalisés à partir d'homogénats cardiaques comprenant le ventricule droit, le septum et la paroi non infarctée du ventricule gauche.

4.1. Activité des enzymes antioxydantes cardiaques

Activité de la thiorédoxine réductase

Dans les groupes « Haut-Se », l'activité de la TR du groupe « IM » est statistiquement comparable à celle de son groupe « SHAM » (IM Haut-Se : $19,31 \pm 2,51$ nM/mg de protéines vs SHAM Haut-Se : $13,85 \pm 1,72$ nM/mg de protéines; $p > 0,05$). De même, dans les groupes « Bas-Se », cette activité est significativement semblable quand on compare le groupe « IM » à son groupe « SHAM » (IM Bas-Se : $8,75 \pm 0,57$ nM/mg de protéines vs SHAM Bas-Se : $7,57 \pm 0,64$ nM/mg de protéines; $p > 0,05$).

Toutefois, l'activité de la TR dans les groupes « Haut-Se » apparaît plus élevée comparée à celle des groupes « Bas-Se » ($p = 0,02$; Kruskal-Wallis).

Bien que non significatifs, ces résultats montrent que l'apport quotidien en sélénium peut modifier l'activité de la TR dans le post-infarctus. Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, l'IDM semble augmenter cette activité enzymatique.

Activité de la glutathion peroxydase

La figure 23 illustre l'effet du sélénium sur l'activité enzymatique de la GPH-Px mesurée dans le tissu cardiaque 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

L'activité GSH-Px tend à augmenter dans le groupe « IM Bas-Se » comparé à son « SHAM ». A l'inverse, celle du groupe « IM Haut-Se » est statistiquement comparable à celle du groupe « SHAM » correspondant.

En revanche, une augmentation significative de l'activité GSH-Px de près de deux fois est observée quand on compare l'activité de cette enzyme entre les groupes « Bas-Se » et « Haut-Se » ($p = 0,0005$; Kruskal-Wallis).

Les résultats montrent qu'une IR et transitoire de 60 minutes n'a pas d'effet significatif sur l'activité de la GSH-Px mesurée à 8 jours post-reperfusion. Ces résultats montrent qu'à 8 jours post-infarctus, l'IDM n'a pas d'effet sur l'activité GSH-Px tandis que la supplémentation alimentaire en sélénium majore significativement son activité.

Activité de la catalase

L'effet du sélénium sur l'activité cardiaque de la catalase mesurée 8 jours après la reperfusion post-ischémique est illustrée par la figure 24.

L'analyse des résultats montre une réduction de l'activité de cette enzyme de près 49% et de 23% respectivement dans les groupes infarcis « Bas-Se » et « Haut-Se » par rapport aux « SHAM » correspondants. Dans les groupes « Bas-Se », cette réduction est statistiquement significative à l'inverse des groupes « Haut-Se ».

De plus, une différence significative est observée dans les groupes ayant un statut élevé en sélénium « Haut-Se » par rapport aux groupes ayant un statut bas en sélénium ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis).

Ces résultats montrent que dans notre modèle, l'IDM diminue significativement l'activité de la catalase tissulaire cardiaque à 8 jours post-infarctus. Le sélénium réduirait cette perte d'activité.

4.2. Niveau d'expression myocardique du TNF- α

La teneur tissulaire cardiaque en TNF- α a été évaluée quantitativement par la méthode ELISA sandwich (figure 25).

Le niveau d'expression tissulaire cardiaque de TNF- α mesuré 8 jours après la reperfusion post-ischémique est significativement diminué dans le groupe « IM » ayant un statut faible en sélénium par rapport au groupe « SHAM » correspondant ($p < 0,001$). En revanche, celui-ci n'est pas statistiquement différent entre le groupe « IM » ayant un statut élevé en sélénium et le groupe « SHAM » correspondant ($p = 0,09$).

Quand on compare les groupes « SHAM », aucune différence significative n'est observée ($p = 0,36$) alors que les groupes « IM » sont statistiquement différents ($p = 0,01$).

Ces résultats montrent que l'élévation de la teneur cardiaque en TNF- α induit par l'IDM apparaît diminuée par le régime fortement enrichi en sélénium. Celui-ci ne semble pas modifier la teneur basale en cette cytokine inflammatoire.

4.3. Niveau d'expression et de déphosphorylation de la Cx43

La figure 26 présente le niveau de Cx43 déphosphorylée (exprimé en UA), mesuré 8 jours après la reperfusion post-infarctus.

Les valeurs du groupe « SHAM Bas-Se » sont statistiquement inférieures à celles du groupe « IM Bas-Se » ($p < 0,01$), alors qu'aucune différence significative n'est observée entre les groupes « SHAM Haut-Se » et « IM Haut-Se » ($p = 0,90$).

Le niveau d'expression de la Cx43 déphosphorylée des groupes « SHAM » sont comparables alors qu'une différence significative est observée entre les valeurs des groupes « IM » ($p < 0,05$).

Comme le montre la figure 28, le niveau d'expression de Cx43 totale dans le tissu myocardique est significativement abaissé dans les groupes « IM » comparé aux groupes « SHAM » quel que soit le statut en sélénium (figure 27).

Nos résultats montrent donc une diminution du niveau total de Cx43 par l'IDM ainsi que du niveau de sa forme déphosphorylée. La supplémentation alimentaire en sélénium semble préserver uniquement le niveau de déphosphorylation en Cx43.

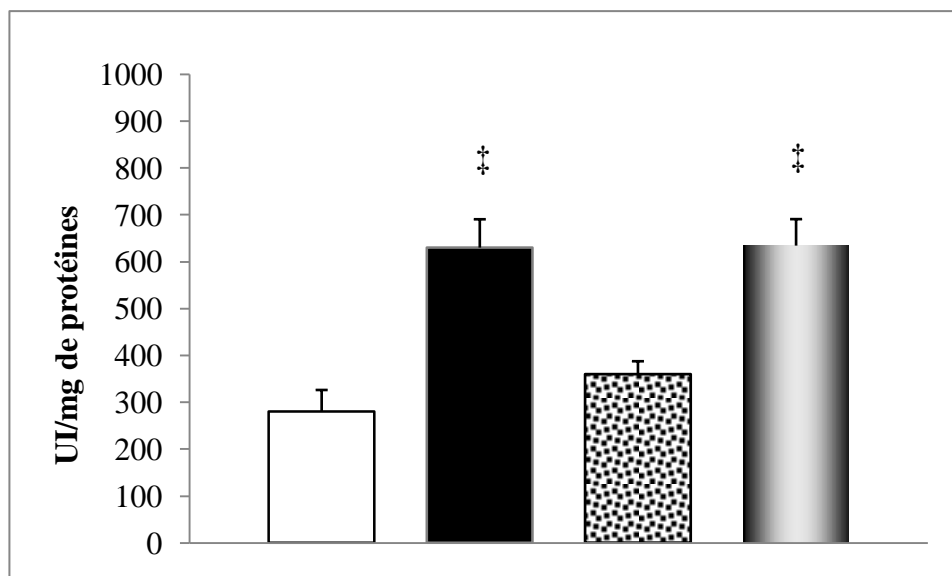


Figure 23 : Effet du sélénium sur l'activité glutathion peroxydase cardiaque mesurée 8 jours après la reperfusion post-infarctus chez le rat.

IM Bas-Se vs SHAM Bas-Se, $p=0,19$; IM Haut-Se vs SHAM Haut-Se, $p=0,80$;
 ‡ $p=0,002$, « SHAM Haut-Se » vs « SHAM Bas-Se »; ‡ $p=0,009$, « IM Haut-Se » vs « IM Bas-Se ».

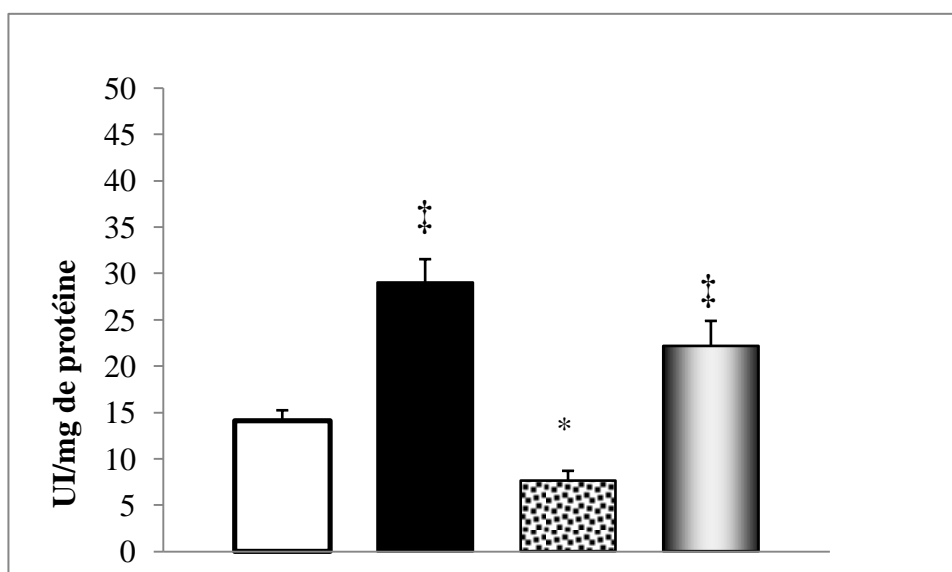


Figure 24 : Effet du sélénium sur l'activité catalase cardiaque mesurée 8 jours après la reperfusion post-infarctus chez le rat.

* $p=0,01$, « IM Bas-Se » vs « SHAM Bas-Se »; ‡ $p<0,01$ « Haut-Se » vs « Bas-Se ».

□ SHAM Bas-Se ; ■ SHAM Haut-Se ; ▨ IM Bas-Se ; ▩ IM Haut-Se.

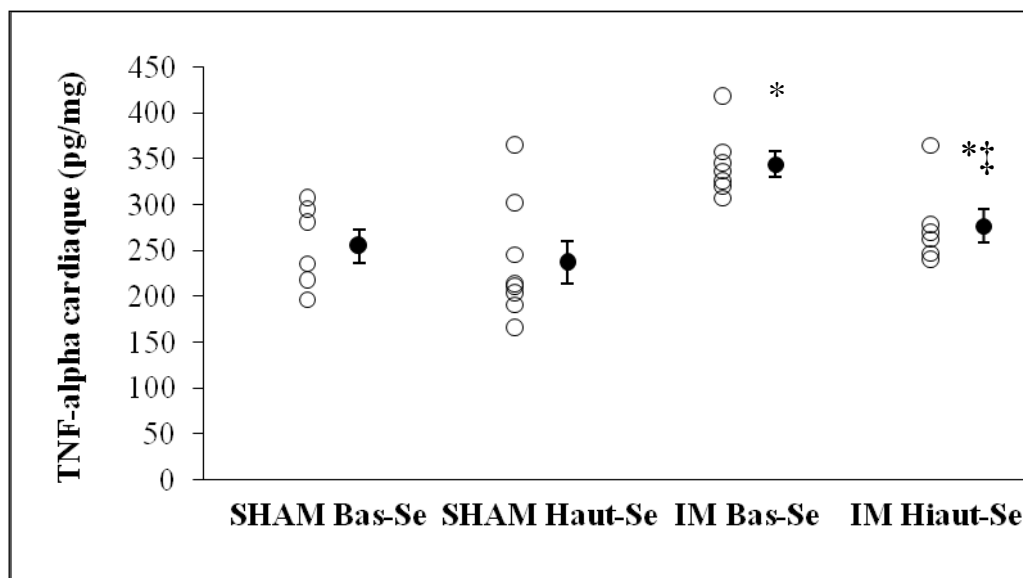


Figure 25 : Effet du sélénium sur la teneur cardiaque en TNF- α mesurée par la technique ELISA sandwich à 8 jours post-infarctus chez le rat.

* $p < 0,05$ vs SHAM; ‡ $p < 0,05$ vs IM BAs-Se, Mann & Whitney.

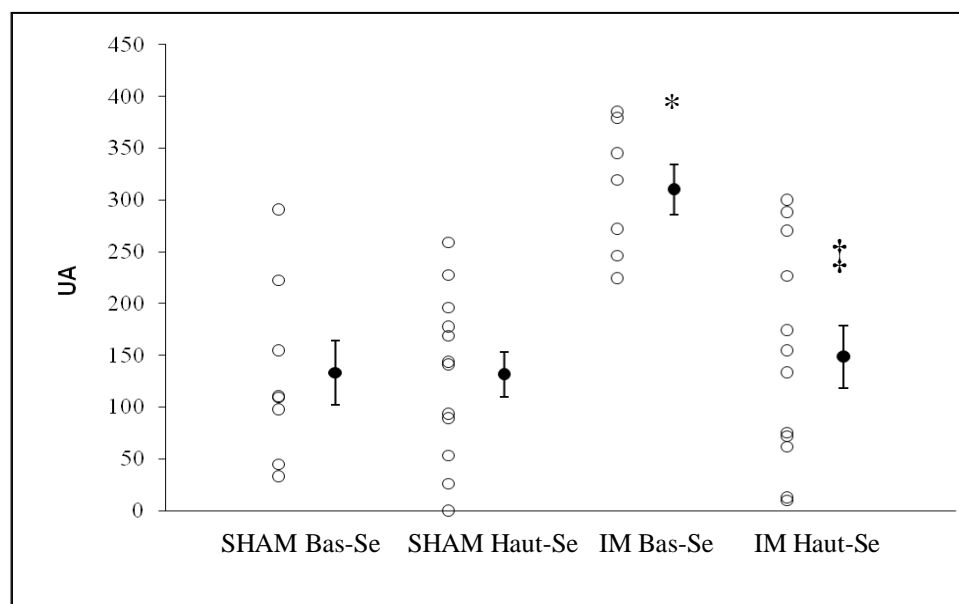


Figure 26 : Effet du sélénium sur le niveau de déphosphorylation de la connexine 43 cardiaque, dosé par WI à 8 jours post-infarctus chez le rat.

* $p < 0,05$ vs SHAM; ‡ $p < 0,05$ vs IM Bas-Se, Mann & Whitney.

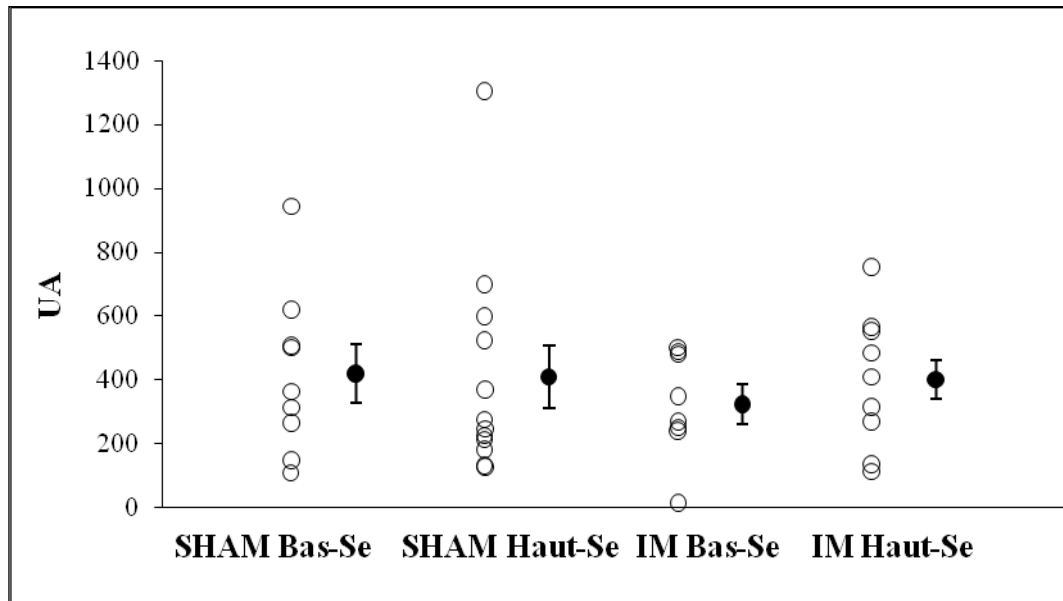


Figure 27 : Effet du sélénium sur le niveau de total cardiaque de la connexine 43 dosé par Western Blot à 8 jours post-infarctus chez le rat.

UA= unité arbitraire.

5. DISCUSSION

Les résultats de cette partie montrent que l'augmentation du statut individuel en sélénium chez le rat, préalablement à l'induction d'un IDM, permet d'augmenter la capacité antioxydante tissulaire cardiaque. De plus, cette approche nutritionnelle diminue significativement le taux de TNF- α myocardique évalué 8 jours après l'ischémie/reperfusion myocardique. Si elle n'a aucun effet sur la diminution du niveau total de Cx43 induit par l'ischémie/reperfusion, la supplémentation en sélénium préserve le niveau de déphosphorylation de la Cx43 myocardique occasionné également par l'IDM.

La limitation de la taille de l'infarctus et l'amélioration des indices du remodelage ventriculaire mises en évidence conjointement (chapitre II) à ces modifications cellulaires et moléculaires suggèrent que celles-ci soient responsables, au moins en partie, des effets cardioprotecteurs du sélénium observés précédemment.

5.1. Remodelage ventriculaire cardiaque et stress oxydant dans le post-infarctus

Il est admis qu'une surproduction d'ERO contribue aux lésions et à la mort cellulaire dans le cœur ischémié/reperfusé (Zweier et Taludkin 2006). La défense cellulaire contre ces espèces très réactives se fait en deux étapes : tout d'abord la dismutation du radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène puis la détoxification de ce dernier. Cette dernière étape étant effectuée principalement par deux enzymes, la catalase et la GSH-Px, nous avons mesuré leurs activités respectives dans nos échantillons myocardiques. Une baisse en l'activité de ces enzymes résulte en une faible élimination des peroxydes d'hydrogène et lipidique alors qu'une augmentation simultanée en ces enzymes peut être bénéfique lors d'une surproduction d'ERO.

Dans cette étude, l'activité de la catalase est statistiquement différente entre les animaux infarcis ayant un statut faible en sélénium et leurs contrôles. A l'inverse, l'activité GSH-Px reste statistiquement comparable bien qu'un affaiblissement a été observé après l'ischémie/reperfusion. En accord avec la littérature (Venardos et coll. 2007), ces observations suggèrent que l'IDM tend à entraîner la perte tissulaire cardiaque en ces enzymes. Bien que nous n'ayons pas dosé les marqueurs de lésions cellulaires tels que la lactate déshydrogénase ou la créatine kinase, il est généralement admis que l'ischémie/reperfusion entraîne des

altérations de la membrane cellulaire qui peut aboutir à la mort cellulaire. Dans ces cas, une fuite des protéines cellulaires dont les enzymes endogènes de défense antiradicalaire peut s'opérer. De plus, la nécrose de près de la moitié du ventricule gauche explique en partie la diminution de l'activité de ces protéines.

Dans les groupes ayant reçu un régime enrichi en sélénium, une augmentation significative en termes d'activité de ces enzymes est observée. Cette hausse traduirait une meilleure protection contre les hydroperoxydes et pourrait expliquer la baisse de la taille de l'infarctus observé 8 jours après la reperfusion post-ischémique dans ce groupe (Kayanoki et coll. 1996 ; Tanguy et coll. 2004). De plus, l'activité catalase cardiaque dans ces groupes d'animaux n'est pas affectée par l'IDM. La production excessive d'hydroperoxydes est capable d'induire non seulement des lésions cellulaires, mais également leur apoptose. Ces résultats confirment qu'une meilleure préservation des systèmes de défense enzymatique contre les ERO au cours d'une séquence d'ischémie/reperfusion peut limiter l'étendu de la nécrose ischémique et par conséquent les modifications structurales cardiaque post-infarctus. Cette étude conforte également l'implication du sélénium et de la GSH-Px dans la cardioprotection.

Le sélénium réduirait la taille de l'infarctus à travers la régulation de différentes voies de signalisation impliquant les ERO et aurait comme effecteur final les caspases. Les travaux de Santamaria et coll. (2005) démontrant que le sélénium est capable de réduire les lésions cellulaire induite par un neurotoxique, le quinolate, en augmentant l'activité de la GSH-Px et en inhibant la voie de signalisation pro-apoptotique associées au NF-kB vont dans ce sens. Sa capacité à inhiber l'activité caspase-3 par un apport quotidien à raison de 0,625 mg/kg et à réduire la fragmentation d'ADN génomique chez le rat, après exposition de la quinolate suggère que le sélénium est capable de réguler l'apoptose. Cette hypothèse est confortée par les résultats d'études *ex-vivo* montrant que le sélénium protège de la mort cellulaire par apoptose en inhibant l'activité caspase-3 (Kayanoki et coll. 1996 ; Park et coll. 2000).

Cet effet bénéfique de l'élément trace sélénium pourrait également être attribué à la TR. Par exemple, celle-ci est la seule enzyme capable de réduire la thiorédoxine dont l'élévation de l'expression a été associée à la réduction de la taille de l'infarctus (Turoczi et coll. 2004). En fait, avec la thiorédoxine et le NADPH, la TR constitue le système thiorédoxine, connu pour être le système majeur de régulation d'oxydoréduction dans l'organisme (Papp et coll. 2007). En réponse à de fortes élévations d'ERO, ce système agirait comme un senseur d'oxydoréduction et un régulateur de la signalisation cellulaire en activant principalement les facteurs de croissance tels que AP-1 ou encore la protéine anti-mort

cellulaire p53 (pour revue, voir Brigelius-Flohe et coll. 2003 et Papp et coll. 2007) et en diminuant le stress oxydant (Turoczi et coll. 2004). Dans la présente étude, bien que la différence ne soit pas significative, la supplémentation alimentaire en sélénium entraîne une augmentation de l'activité TR.

Un apport quotidien en sélénium à dose nutritionnelle préserverait alors le statut rédox cellulaire en stimulant l'activité des sélénoprotéines TR et GSH-Px. En augmentant le pouvoir antioxydant tissulaire, le sélénium est capable de freiner ou de diminuer la perte cellulaire myocardique induite par l'ischémie/reperfusion. En accord avec la littérature nos résultats confirment l'implication du sélénium et plus particulièrement de la GSH-Px dans la protection cellulaire cardiaque au cours de l'ischémie/reperfusion qui semble perdurer jusqu'à une semaine post-infarctus.

5.2. Niveau d'expression myocardique en TNF- α et remodelage ventriculaire précoce post-infarctus: implication du sélénium

Des études antérieures ont déjà montré les effets bénéfiques de l'inhibition myocardique du TNF- α dans la phase précoce du post-infarctus (Bertonneche et coll. 2004 ; Higuchi et coll. 2004). En plus de la diminution de la taille d'infarctus ainsi que de l'amélioration des indices morphométriques, nos résultats montrent clairement une réduction du taux cardiaque en TNF- α dans les groupes d'animaux infarcis ayant un statut élevé en sélénium. Dans le cadre de notre étude, la limitation de la production de TNF- α pourrait être également impliquée dans la limitation de la mort cellulaire engendrée par l'ischémie/reperfusion et de ses conséquences structurelles observées. L'augmentation du statut plasmatique en sélénium préalablement à l'induction d'un IDM, par un apport oral (150 μ g/jour), semble donc exercer un effet cardioprotecteur via la réduction significative de la teneur cardiaque en TNF- α dans la phase précoce du post-infarctus.

Une des hypothèses probables pouvant expliquer cet effet est la réduction du stress oxydant par le sélénium. Une moindre production cellulaire d'ERO ou une amélioration du système antioxydant cellulaire pourrait limiter la production de TNF- α induite par l'IR et expliquer la baisse de TNF- α observée dans le myocarde ayant un statut élevé en sélénium. En effet, la production d'ERO a été corrélée positivement à l'exposition cellulaire au TNF- α (Nakamura et coll. 1998 ; Moe et coll. 2004). Le TNF- α de même que l'Ang II dont les

teneurs respectives augmentent dans le post-infarctus sont capables d'augmenter la production cellulaire cardiaque en ERO (Nakamura et coll. 1998). Les travaux de Suematsu et coll. (2003) ont également démontré que le TNF- α peut induire directement la production mitochondriale d'ERO alors que l'Ang II augmente la production d'ERO à travers la stimulation de NADPH oxydase. Cette surproduction d'ERO à travers le TNF- α a été impliquée dans les modifications structurales des myocytes comme l'hypertrophie (Higuchi et coll. 2004). La nette augmentation de la capacité antioxydative tissulaire cardiaque consécutive à l'augmentation du statut en sélénium suggère qu'à travers cette modification, le sélénium pourrait limiter effectivement la production de TNF- α .

Cependant, ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer que la diminution du taux de TNF- α cardiaque observée soit le résultat d'un effet direct du sélénium sur la production de celle-ci. En effet, une moindre dilatation de la cavité ventriculaire gauche pourrait être également responsable d'une baisse de la production de TNF- α du fait d'un moindre étirement mécanique des parois (Feldman et coll. 2000). Toutefois, une diminution des contraintes pariétales du fait d'une moindre perte cellulaire et probablement d'une meilleure restructuration de la paroi ventriculaire gauche post-ischémique est envisageable.

Différents stimuli peuvent induire la production de TNF- α (Feldman et coll. 2000), le plus puissant et le mieux caractérisé étant le lipopolysaccharide (LPS). En se liant à des protéines sériques comme la LBP (lipoprotein-binding protein), le LPS va influencer positivement ou négativement la réponse inflammatoire des macrophages (figure 28). Les travaux de Vunta et coll. (2007) ont démontré que le sélénium peut augmenter la production de la prostaglandine J2 (Vunta et coll. 2007). Celle-ci ayant une activité endogène d'inhibiteur d'I κ B-kinase, peut réprimer les réponses inflammatoires médiée par le LPS à travers l'inhibition de NF- κ B et par conséquent la production de TNF- α . De plus, la prostaglandine J2 est également capable d'inhiber la voie d'activation de NF- κ B à travers l'activation directe PPAR γ (Pascual et coll. 2005). Dans leurs expérimentations, la supplémentation en sélénium dans une culture de macrophages augmente significativement la production de la prostaglandine J2 en même temps qu'elle diminue l'expression de 2 gènes pro-inflammatoires, les gènes de COX2 et de la iNOS (Vunta et coll. 2007). La diminution de la production de TNF- α dans notre expérimentation pourrait donc résulter de ces deux voies de signalisation.

Les voies de signalisation cellulaires du TNF- α ne sont pas totalement élucidées au niveau du myocyte. Même s'il existe deux types de récepteurs au TNF- α , la plupart des activités biologiques du TNF- α sont médiées par le récepteur de type 1 et aboutissent à un

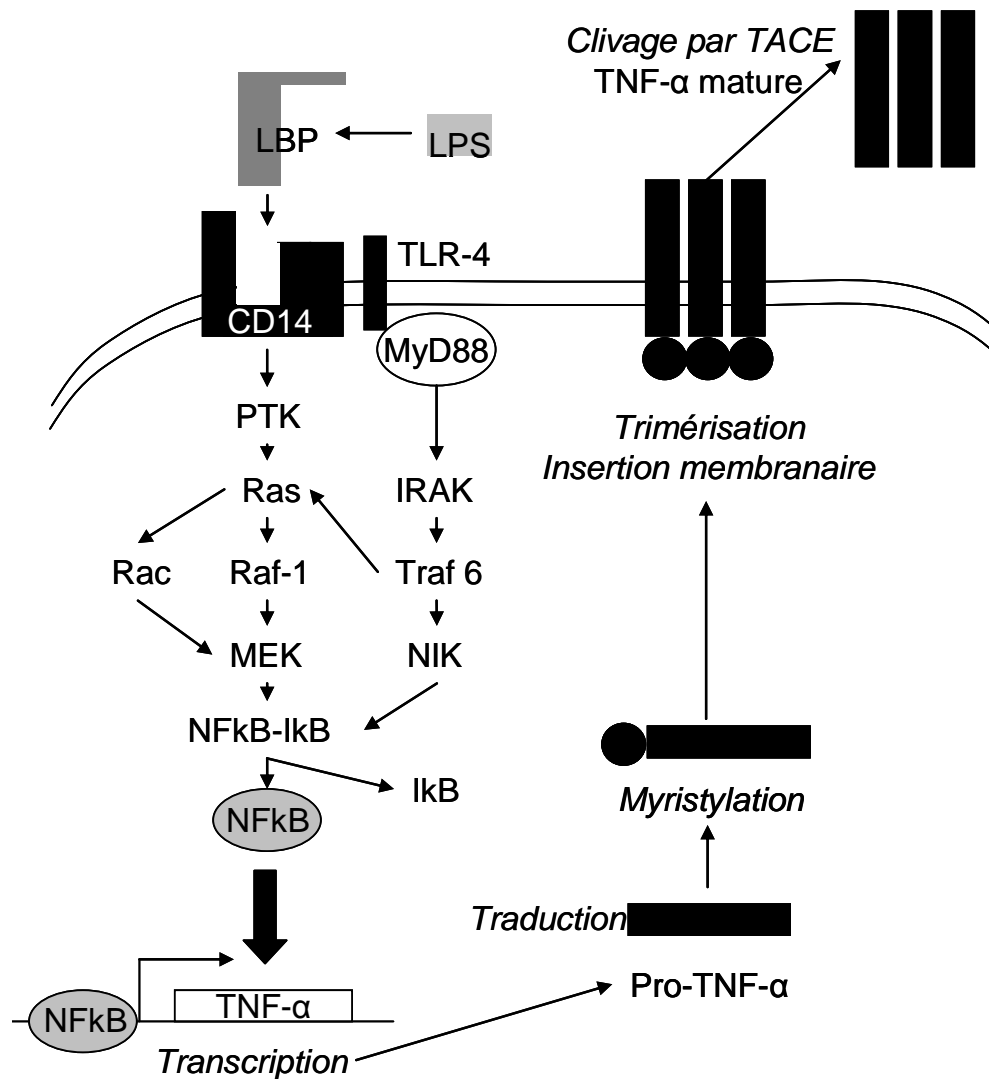


Figure 28 : Voies de signalisation intracellulaires à l'origine de la synthèse du TNF- α

I κ B = inhibitory subunit kB ; IRAK= interleukin-1 receptor accessory protein kinase ; LBP = lipoprotein binding protein ; LPS = lipopolysaccharide ; MEK = MAP Erk kinase ; MyD88 = myeloid differentiation factor ; NF-kB = nuclear factor kB ; NIK = NF-kB-inducing kinase ; PTK = protein tyrosine kinase ; TACE = enzyme de conversion du TNF α ; TLR = Toll-like receptor ; TNF α = tumour necrosis factor alpha ; Traf = tumour necrosis factor-receptor-associated factor.

(d'après la thèse de C.Bertonneche, 2003)

effet dit pléiotropique. La liaison du TNF- α à son récepteur peut par exemple conduire à l'activation des protéines de voies de signalisation de l'apoptose, les caspases, et entraîner la mort cellulaire. L'activation des ces récepteurs peut conduire également au recrutement de MAPK, d'I κ B et de la NADPH oxydase (Chen et Goeddel 2002), protéines jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire. Grâce à la diminution de la production et/ou à la stimulation de la dégradation du TNF- α , le sélénium réduirait alors le processus inflammatoire et la mort cellulaire responsables du remodelage pathologique cardiaque.

Les effets néfastes du TNF- α au niveau du myocarde semblent également provenir des ERO. Les travaux de Moe et coll. (2004) ont démontré que l'inhibition du TNF- α réduit à la fois la dysfonction mitochondriale et le stress oxydatif en plus de la diminution de l'apoptose dans un modèle expérimental d'insuffisance cardiaque, ce qui suggère une implication étroite des ERO et du TNF- α dans l'amélioration du remodelage ventriculaire post-infarctus. Il a été suggéré que le TNF- α cause des lésions irréversibles au niveau de l'ADN mitochondrial grâce à l'activation de sphingomyélinases provoquant ainsi l'inhibition de la chaîne de respiration mitochondriale et une dysfonction mitochondriale. De plus, la surproduction d'ERO a été associée au dysfonctionnement contractile cardiaque et au remodelage structural chez la souris (Nakamura et coll. 2003). Or, le stress oxydant est impliqué dans l'apoptose et la fibrose intersticielle alors que les ERO sont également connues pour augmenter l'expression des cytokines inflammatoires telles que le TNF α (Tolando et coll. 2000). En activant un certain nombre de protéines (ex p38 MAPK et NF- κ B), elles peuvent mener à la libération des cytokines inflammatoires, et propageant ainsi les signaux pro-inflammatoires (Feldman et coll. 2000 ; Jamaluddin et coll. 2007). Ce cercle vicieux peut alors contribuer au développement des altérations structurales du myocarde.

En inhibant la synthèse de TNF- α , le sélénium pourrait limiter, de ce fait, (i) la production d'ERO et les dommages oxydatifs, (ii) l'infiltration leucocytaire locale et macrophagique au niveau du myocarde infarci, ainsi que (iii) le processus de mort cellulaire au cours du remodelage ventriculaire.

5.3.Effet du sélénium sur la connexine 43 : implication dans le remodelage ventriculaire précoce post-infarctus

Les AVM sont responsables en majeure partie de l'arrêt cardiaque après un IDM. Nous avons montré que l'élévation du statut plasmatique en sélénium préalablement à

l'induction d'un IDM expérimental diminue significativement la mortalité due à ces arythmies. Cet effet protecteur est indépendant de la fonction cardiaque documentée dans le chapitre II et est associé à une préservation du niveau de déphosphorylation de la Cx43 dans le myocarde non infarci. En accord avec la littérature (Beardslee et coll. 2000 ; Miura et coll. 2004), les résultats de cette étude montrent que l'ischémie/reperfusion induit la déphosphorylation de la Cx43 *in-vivo* et que l'augmentation du statut plasmatique en sélénium préserve cette déphosphorylation. Ils confirment donc ceux obtenus *ex-vivo* (Rakotovo et coll. 2005) montrant un rôle protecteur du sélénium dans la préservation du niveau de phosphorylation en Cx43 au cours de l'ischémie ou ischémie/reperfusion.

Les mécanismes à l'origine de FV dues à l'ischémie et plus particulièrement le rôle du couplage électrique dans l'initiation et le maintien de ces arythmies restent mal connus. Il est toutefois fortement suggéré que la réduction du découplage cellulaire consécutive à la préservation du niveau de déphosphorylation de la Cx43 au cours de l'ischémie réduirait la vulnérabilité aux FV en diminuant les hétérogénéités électriques et métaboliques entre les zones bordantes et le tissu sain (Jongsma et Wilders 2000 ; Roell et coll. 2007). Les travaux de Miura et coll. (2004) suggèrent que la déphosphorylation rapide de la Cx43 durant les premières minutes de l'ischémie qui entrainerait la fermeture des JCs formées par celles-ci, puis le maintien d'un niveau adéquat en Cx43 phosphorylée, par la suite, seraient nécessaires à cette cardioprotection.

A ce jour, plusieurs mécanismes ont été évoqués dans le contrôle de la phosphorylation de la Cx43 dans les MCV. La Cx43 possède plusieurs sites phosphorylables dont les conséquences fonctionnelles sont variables (Lampe et coll 2000). Dans l'ischémie/reperfusion, la phosphorylation dépendante des PKC (proteine kinase C) principalement au niveau des résidus régulant la communication jonctionnelle, est un des mécanismes privilégiés dans la cardioprotection (Lampe et coll 2000). L'implication d'autres protéines kinases telles que la PKA (proteine kinase A) et la p38 MAPK ont également été évoquées (Warn-Cramer et coll. 1996). Si nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que la préservation du niveau de phosphorylation de la Cx43 cardiaque observée résulte d'un effet direct du sélénium sur des kinases ou phosphatases, la capacité du sélénium à activer la p38 MAPK pourrait constituer une voie probable dans la préservation de l'état de phosphorylation. En effet, il a été montré que la Cx43 peut être phosphorylée à travers la voie de signalisation de la p38 MAPK (Warn-Cramer et coll. 1996). L'augmentation du statut plasmatique en sélénium préserverait le niveau de déphosphorylation de la Cx43 en favorisant l'activité MAPK.

6. CONCLUSION

L'ensemble de nos données montrent que la supplémentation alimentaire en sélénium se traduit par l'augmentation significative du statut plasmatique en cet élément. Le bénéfice obtenu par cette stratégie (diminution de la taille de la nécrose, amélioration des indices morphométriques) s'accompagne d'une élévation de la capacité antioxydante tissulaire et plus particulièrement de l'aptitude du tissu cardiaque à détoxifier les hydroperoxydes confirmant ainsi l'implication de la part antioxydante du sélénium dans la cardioprotection. Il est également associé à la limitation significative du taux cardiaque en TNF- α , dont la teneur augmente dans le post-infarctus. Cette étude met pour la première fois en évidence un lien entre le sélénium et le TNF- α dans les conséquences cardiaques post-infarctus. Le sélénium est capable de limiter les altérations fonctionnelles au cours de l'ischémie et les altérations morphométriques au cours de la première semaine post-infarctus chez le rat.

De plus, cette étude confirme l'importance du sélénium dans la préservation du niveau de déphosphorylation de la Cx43 *in-vivo* qui semble jouer un rôle primordial dans la limitation de FV au cours de l'ischémie myocardique consolidant l'hypothèse de l'implication du stress oxydant dans la déphosphorylation de la Cx43.

Chapitre IV

Conséquences de l'infarctus du myocarde
sur le statut en oligo-éléments essentiels et
le sélénium chez le rat

1. INTRODUCTION

Il est bien admis que le stress oxydant du tissu ischémique a des conséquences sur la physiologie membranaire, en particulier sur la fonction des canaux, des pompes et des échangeurs ioniques, mais également sur le remodelage de la Cx43 (Goldhaber JI 1996 ; Rakotovo et coll. 2005). De même qu'il a été corrélé à la dysfonction cardiaque, au processus inflammatoire et au mécanisme de signalisation pro-apoptotique (Von Harsdorf et coll. 1999).

Nous avons donc élargi notre champ d'étude en envisageant le rôle d'autres éléments clés impliqués dans les mécanismes de la défense antiradicalaire des cellules eucaryotes. Différentes études soulignent en effet, le rôle que certains oligo-éléments peuvent jouer, dans le développement des lésions cellulaires associées à la reperfusion post-ischémique, en modulant l'activité d'enzymes cellulaires antioxydantes, comme par exemple la SOD ou la GSH-Px (Pucheu 1994 ; Tanguy et coll. 1998). En effet, certains de ces oligo-éléments sont impliqués dans des réactions qui conduisent à la production d'ERO (Halliwell et Gutteridge 1990), soit comme antioxydant cofacteur des enzymes de défense antiradicalaires. C'est le cas du zinc (Zn), du cuivre (Cu), du manganèse (Mn) ou du sélénium, soit comme pro-oxydant (en particulier le fer (Fe)). La carence ou l'excès de ces éléments peuvent modifier un certain nombre de fonctions cellulaires dont la défense antiradicalaire. Or, des études réalisées au laboratoire ont montré qu'une carence en sélénium ou en Mn peut entraîner celle d'autres oligo-éléments (Pucheu, 1994).

Nous avons émis l'hypothèse que l'IDM en lui-même est capable d'induire une utilisation accrue de sélénium durant la phase précoce du post-infarctus, ce qui pourrait provoquer une carence en cet élément et en d'autres oligo-éléments essentiels qui interviennent dans les mécanismes des systèmes de défense antioxydante. En conséquence, la modification du statut en sélénium et en oligo-éléments essentiels causerait un déséquilibre entre la production d'ERO et les systèmes de défenses naturelles avec pour conséquences de favoriser les lésions de reperfusion dont la propagation de la mort cellulaire et par la même occasion, modifierait les fonctions cellulaires auxquelles participent chacun des co-facteurs.

Pour discriminer les effets du sélénium d'une adaptation cellulaire et moléculaire s'opérant durant la phase précoce du post-infarctus, nous avons suivi l'évolution de ces quelques éléments métalliques co-facteurs d'enzymes. Puisque le rôle de ces cofacteurs dans l'activité de ces enzymes est bien connu, nous avons également évalué cette activité. Nous

avons cherché à établir un éventuel lien entre les concentrations en ces différents oligo-éléments et les paramètres expérimentaux observés en post-infarctus.

Dans un deuxième temps, pour déterminer si le statut initial en sélénium influence l'issue de l'IDM, nous avons étudié la relation entre différents statuts en sélénium et les conséquences structurales et morphologiques cardiaques d'une ischémie/reperfusion au cours de cette phase.

2. METHODES

2.1. Groupes expérimentaux

Dans cette étude, 15 rats mâles adultes de souche Wistar (Harlan, Nederland), d'un poids corporel compris entre 270 et 330 g ont été utilisés. Les animaux ont été répartis aléatoirement soit dans un groupe soumis à un protocole d'ischémie/reperfusion semblable à celui décrit dans le chapitre II (groupe **IM Contrôle**), soit dans un groupe soumis au même protocole chirurgical mais non soumis à une ischémie myocardique (groupe **SHAM Contrôle**).

Ces animaux ont été nourris au régime standard de laboratoire dont la teneur moyenne en sélénium est de l'ordre de 0,20 mg/kg.

De plus, les deux groupes « IM » (IM Bas-Se et IM Haut-Se) des précédents chapitres ont été utilisés pour des études comparatives.

2.2. Protocole expérimentale

2 jours avant la procédure d'ischémie/reperfusion (J0) puis à 1, 3, 6 et 8 jours après la reperfusion post-ischémique (J1, J2, J3, J5 et J8), des échantillons sanguins (0,8 mL) sont recueillis et traités comme précédemment décrit (3.1.2 *Méthodes générales*). Puis, les concentrations plasmatiques en oligo-éléments essentiels (Cu, Zn, Fe, Mn et sélénium) sont évaluées par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (Perkin-Elmer) au sein du service de Biochimie C, CHU, Grenoble (J. Arnaud).

Après 8 jours de reperfusion, l'activité cardiaque en SOD, catalase, GSH-Px et TR ainsi que la taille de l'infarctus ont été étudiées et mesurées.

3. RESULTATS

3.1. Effet de l'infarctus du myocarde sur la fonction cardiaque mesurée à 8 jours de reperfusion

Poids des animaux

Nous avons suivi le poids des animaux en fonction du nombre de jours de reperfusion : 1, 2, 3, 6 et 8 jours post-reperfusion (figure 29). Ce paramètre permet en effet d'indiquer une détérioration de l'état général des animaux.

Bien que le poids corporel moyen des animaux utilisés dans les groupes « Contrôles » soit différent de la moyenne des deux autres groupes (« Bas-Se » et « Haut-Se »), l'allure générale de la courbe obtenue est identique entre eux ($p > 0,005$; Benferroni).

L'ischémie régionale du myocarde suivie de reperfusion provoque une baisse pondérale (~ 5%) des animaux à 1 jour post-infarctus et devient significative (~15%) à 3 jours post-infarctus dans le groupe « Low-Se » ($p = 0,04$). Ensuite, l'évolution pondérale tend à retrouver sa valeur initiale au bout des 8 jours post-reperfusion. Toutefois, le groupe « High-Se » semble montrer plus de capacité de récupération pondérale que les autres groupes.

Fonction cardiaque

La fonction cardiaque mesurée 8 jours après occlusion de l'ACG (60 min) suivie de reperfusion est présentée par le tableau 23.

Les paramètres hémodynamiques cardiaques (pression diastolique du ventricule gauche, dérivée première maximale de la pression ventriculaire gauche, pression artérielle et fréquence cardiaque) sont comparables entre les groupes « SHAM » et « IM » à 8 jours post-infarctus. En revanche, la pression développée du ventricule gauche est statistiquement diminuée dans le groupe « IM ».

Dans notre modèle, l'ischémie régionale suivie de reperfusion affecte la pression diastolique cardiaque mesurée à 8 jours de reperfusion.

Compliance passive *ex-vivo*

La figure 30 présente l'évolution de la pression ventriculaire gauche en fonction du volume de liquide physiologique perfusé dans la cavité ventriculaire gauche.

Le protocole d'ischémie/reperfusion induit un décalage vers la droite de la courbe pression volume ainsi obtenue par rapport au groupe « SHAM ». Cet effet traduit une dilatation de la cavité ventriculaire gauche comme en témoigne l'augmentation du volume mort (tableau 24). De plus, une augmentation significative du volume résiduel télédiastolique est observée.

Les constantes de rigidité k_1 , k_2 et k_3 ne sont pas statistiquement différentes entre les deux groupes.

Cette étude met en évidence une altération de la compliance tissulaire cardiaque et le développement d'une dilatation du ventricule gauche à 8 jours de reperfusion post-ischémique.

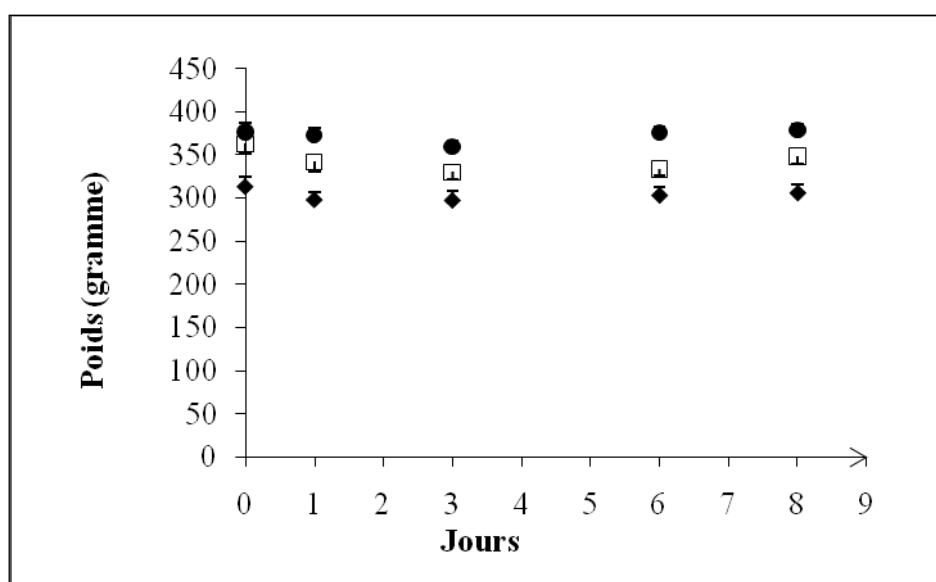


Figure 29 : Evolution pondérale des animaux au cours du post-infarctus.

□ IM Bas-Se ; ◆ IM Contrôle ; ● IM Haut-Se

Tableau 23 : Fonction cardiaque mesurée à 8 jours de reperfusion post-ischémique.

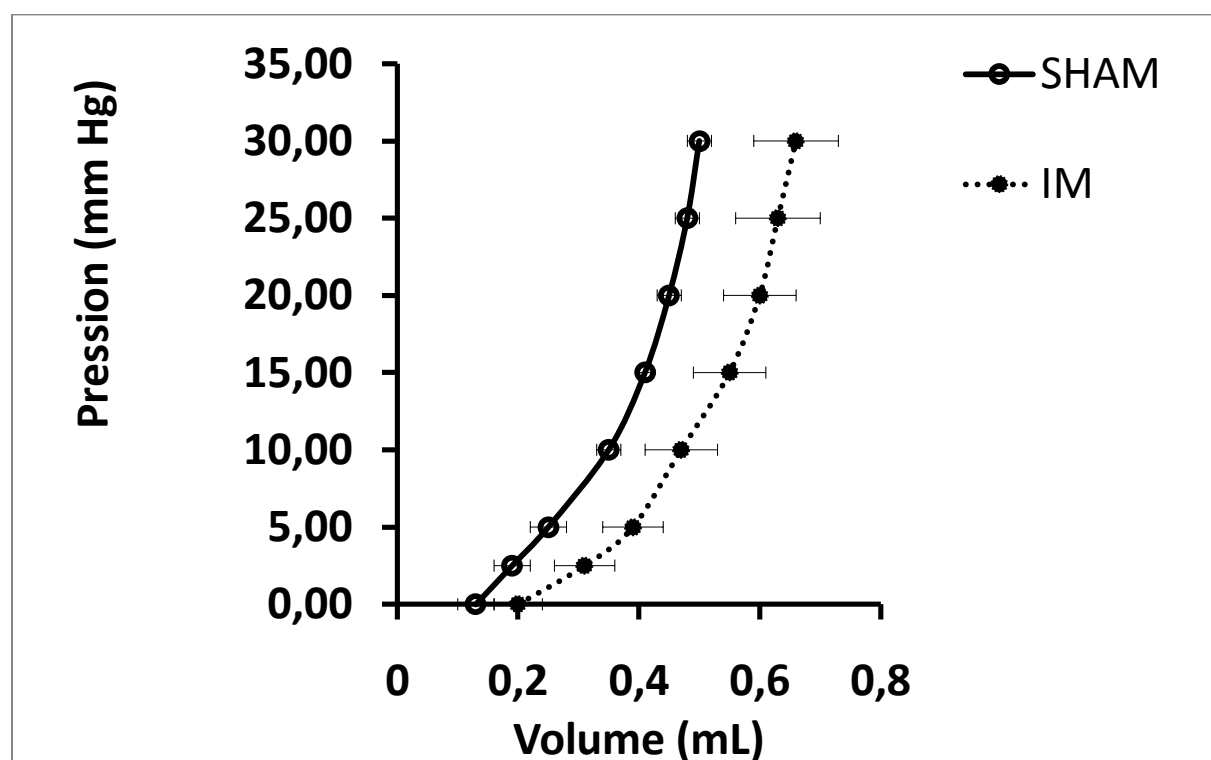
	SHAM Contrôle (n=4)	IM Contrôle (n=7)	Statistiques
FC (bat/min)	288,12 ± 14,66	274,05 ± 8,99	ns
PA (mm Hg)	90,46 ± 5,81	72,22 ± 3,48	ns
PDst (mm Hg)	1,05 ± 1,39	1,57 ± 0,44	ns
PDev (mm Hg)	108,42 ± 7,91	95,82 ± 5,35*	<0,05
dP/dT max (mm Hg/s)	2463,67 ± 124,85	2022,14 ± 146,44	ns
dP/dT min (mm Hg/s)	2310,54 ± 284,22	1840,30 ± 179,30	ns

FC= fréquence cardiaque ; PA=pression artérielle ; PDst= pression diastolique ;
dP/dT= dérivées premières de la pression développée.

Tableau 24 : Constantes de rigidité k, volume mort et volume mort résiduel télédiastolique déterminés à partir des courbes pression-volume.

	SHAM Contrôle (n=4)	IM Contrôle (n=7)	Statistiques
K1	46,54 ± 4,01	43,31 ± 3,62	ns
K2	9,17 ± 0,50	9,02 ± 0,49	ns
K3	8,28 ± 1,00	8,32 ± 0,75	ns
VDst	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,04	<0,05

K1-3= constantes de rigidité 1 à 3 ; VDst= volume télédiastolique.

**Figure 30** : Evolution des courbes pression-volume réalisées 8 jours après le protocole d'ischémie/reperfusion.

3.2. Effet de l'infarctus du myocarde sur le statut plasmatique en sélénium et en oligo-élément essentiels (tableau 25)

Sélénium

La teneur plasmatique moyenne en sélénium des animaux avant l'occlusion de l'ACG est de $5,44 \pm 0,49 \mu\text{M}$. Cette valeur est abaissée significativement (près de 41% de sa valeur initiale) dès le premier jour de reperfusion post-ischémique, puis redevient normale après 8 jours de reperfusion post-ischémique.

Cuivre

La teneur plasmatique moyenne en cuivre mesurée avant l'occlusion de l'ACG et après la reperfusion post-ischémique est présentée dans le tableau 25. La cuprémie diminue significativement après 1 jour de reperfusion ($p=0,02$), puis retrouve sa valeur normale après 3 jours de reperfusion (J1 vs J3, $p=0,01$).

Zinc

Bien que la zincémie baisse entre le premier jour et le troisième jour de reperfusion, celle-ci reste statistiquement comparable au cours du post-infarctus. En effet, à 8 jours post-reperfusion, les animaux infarctés présentent une zincémie proche de la valeur mesurée avant l'induction de l'IDM.

Fer

Le dosage des deux formes du fer (Fe^{2+} , Fe^{3+}) montre qu'aucune modification des concentrations plasmatique en fer n'est observée.

Manganèse

La teneur moyenne en manganèse plasmatique diminue significativement à 3 jours post-infarctus. A l'inverse, un pic de manganèse est observé à 5 jours de reperfusion post-ischémique. Ensuite, la teneur en cet élément redevient normale au bout des 8 jours de reperfusion post-ischémique.

Tableau 25 : Effet de l'infarctus du myocarde sur la teneur plasmatique totale en oligo-élément essentiels mesurée au cours du post-infarctus chez le rat.

	Chronologie des prélèvements					
	J0 (n=7)	J1 (n=4)	J2 (n=4)	J3 (n=5)	J5 (n=3)	J8 (n=5)
Sélénium (μM)	5,44 \pm 0,44	3,89 \pm 0,06*	4,47 \pm 0,41*	3,85 \pm 0,45*	3,83 \pm 0,32*	5,17 \pm 0,49
Cuivre (μM)	17,42 \pm 0,70	14,19 \pm 1,73*	17,68 \pm 0,87	18,98 \pm 0,68	18,49 \pm 1,71	16,11 \pm 1,37
Zinc (μM)	17,7- \pm 2,70	15,07 \pm 1,18	14,27 \pm 0,36	12,32 \pm 0,91	18,42 \pm 2,39	23,95 \pm 4,10 [§]
Fer (μM)	49,98 \pm 4,47	55,87 \pm 9,28	50,32 \pm 1,53	57,10 \pm 2,80	68,95 \pm 14,69	54,10 \pm 4,55
Manganèse (μM)	75,46 \pm 3,96	93,08 \pm 10,48	72,21 \pm 5,54	50,52 \pm 6,51**	135,60 \pm 19,75** ^{‡§}	70,16 \pm 7,29 ^{##}

*, $p < 0,05$ vs J0 ; †,vs J1 ; ‡,vs J2 ; § vs J3 ; ## vs J5.

J0 ; J1 ; J2 ; J3 ; J5 ; J8= chronologie en jours de reperfusion post-ischémique

3.3.Effet de l'infarctus du myocarde sur la capacité antioxydante cardiaque

Le tableau 26 illustre les activités tissulaires cardiaques des enzymes antioxydantes mesurées dans les groupes « Contrôle ».

Une diminution significative de l'activité SOD est observée dans le groupe « IM » par rapport au groupe « SHAM » ($p < 0,01$) à 8 jours post-infarctus. L'occlusion de l'ACG suivie de 8 jours de reperfusion abaisse donc cette activité.

L'analyse du tableau montre que l'activité de la TR mesurée dans le tissu cardiaque des deux groupes reste statistiquement comparable ($p > 0,05$) bien qu'une augmentation de l'activité mesurée dans le groupe « IM » soit observée.

L'activité cardiaque de la catalase est diminuée significativement dans le groupe « IM » par rapport à son « SHAM » ($p < 0,05$).

Enfin, l'activité de la GSH-Px myocardique dans les deux groupes reste significativement comparable. Toutefois, une tendance à l'augmentation de cette activité dans le groupe infarci est observée.

Ces résultats démontrent un affaiblissement conséquent de la capacité antioxydante tissulaire du tissu cardiaque en termes d'activité SOD et catalase, après occlusion de l'artère coronaire gauche (60 min) suivie de 8 jours de reperfusion. Cet effet aurait, entre autres, comme conséquence une altération du pouvoir antiradicalaire, principalement dirigé contre les radicaux superoxydes ainsi que les hydroperoxydes.

3.4. Statut plasmatique en sélénium, taille de l'infarctus et indices morphométriques

Afin d'étudier la corrélation entre le statut plasmatique en sélénium et les conséquences de l'IDM sur les différents paramètres ci-dessous, nous avons comparés le groupe IM Contrôle avec les deux précédents groupes : « IM Bas-Se » et « IM Haut-Se » entre eux.

Statut en sélénium

En comparant le statut plasmatique des 3 groupes IM (figure 34), on observe une différence significative entre le groupe « Bas-Se » et les groupes « Contrôle » et « Haut-Se » ($p < 0,01$). Toutefois, la teneur plasmatique moyenne du groupe « Haut-Se » et celle du groupe « Contrôle » sont statistiquement équivalentes ($p = 0,06$). Rappelons que les teneurs plasmatiques en sélénium des groupes « Bas-Se » et « Haut-Se » sont statistiquement différentes (Chapitre II).

Taille de l'infarctus

Les tailles d'infarctus des deux groupes de rats ligaturés « Contrôle » et « Haut-Se » sont équivalentes (figure 31). À l'inverse, la taille de l'infarctus mesurée dans le groupe « Bas-Se » est significativement supérieure à celle mesurée dans les groupes « Contrôle » et « Haut-Se » ($p < 0,04$).

Nous avons voulu vérifier s'il existait une relation directe entre le statut en sélénium et la taille de l'infarctus. Dans les 3 groupes expérimentaux, nous avons pu mettre en évidence, une corrélation positive ($p < 0,001$; Spearman).

Géométrie cardiaque

Les figures 32 et 33 présentent les indices morphométriques cardiaques, mesurés 8 jours après occlusion de l'ACG, en fonction du statut plasmatique en sélénium.

Les indices morphométriques cardiaques mesurés dans les groupes « SHAM » sont identiques quelque soit le statut en sélénium. De plus, les valeurs calculées dans les groupes « SHAM » sont significativement différentes de celles des groupes « IM ».

L'indice de dilatation des cavités est équivalent entre les différents groupes « IM » (figure 32A).

Dans ces groupes, l'indice de rétrécissement des parois ventriculaires est statistiquement comparable entre les groupes « Bas-Se » et « Contrôle » ($p = 0,29$) (figure

32B). Cet indice est également comparable entre les groupes « IM Haut-Se » et « IM Contrôle » ($p=0,08$). Rappelons que l'indice de rétrécissement mesuré dans le groupe « IM Bas-Se » est significativement diminué par rapport au groupe « IM Haut-Se » ($p=0,01$).

Enfin, l'indice d'expansion calculé dans les groupes « IM Bas-Se » et « IM Haut-Se » est significativement comparable à la valeur mesurée dans le groupe « IM Contrôle » ($p=0,03$) (figure 32C). Toutefois, l'indice d'expansion mesuré dans le groupe « IM Bas-Se » est significativement supérieur à celui mesuré dans le groupe « IM Haut-Se » ($p<0,05$).

L'épaisseur minimale de la paroi libre du VG est significativement diminuée dans les 3 groupes ligaturés par rapport aux groupes « SHAM ». Comme le montre la figure 33, l'amincissement de la paroi libre du VG dans les groupes « IM Contrôle » et « IM Haut-Se » est important et identique ($p=0,17$). Néanmoins, on observe un moindre amincissement dans les groupes « IM Contrôle » et « IM Haut-Se » par rapport au groupe « IM Bas-Se » ($p<0,01$).

L'épaisseur minimale de la paroi libre ventriculaire droite mesurée dans les 3 groupes infarcis est significativement différente ($p<0,01$). En effet, dans le groupe « IM Contrôle », on observe une augmentation significative de l'épaisseur du VD par rapport aux autres groupes. L'épaisseur minimale moyenne du VD des groupes « IM Bas-Se » et « IM Haut-Se » est statistiquement comparable ($p=0,35$).

De même, dans le groupe « IM Contrôle », on observe une augmentation significative de l'épaisseur du septum par rapport aux autres groupes ($p<0,01$). Toutefois, l'épaisseur de septum mesurée dans le groupe « IM Bas-Se » est statistiquement comparable à celle mesurée dans le groupe « IM Haut-Se ».

Notre étude a permis de mettre en évidence une variation de la taille de l'infarctus en fonction de la teneur plasmatique en sélénium. Nos résultats suggèrent une forte corrélation entre l'affaiblissement du statut préischémique en sélénium et les altérations des indices morphométriques cardiaque dans le post-infarctus, probablement lié à l'augmentation de la taille de l'infarctus et à l'altération des facteurs mécaniques.

Tableau 26 : Activité cardiaque des enzymes antioxydantes mesurée 8 jours après reperfusion du tissu ischémique.

	SHAM Contrôle (n=4)	IM Contrôle (n=7)	Statistiques
SOD (U/mg)	58,66 ± 7,75	28,11 ± 2,94	0,008
Catalase (U/mg)	55,46 ± 6,03	22,02 ± 4,56	0,01
TR (nM/min/mg)	7,31 ± 2,85	13,52 ± 2,13	>0,05
GSH-Px (U/mg)	602,35 ± 62,24	745,01 ± 28,65	0,05

Les groupes ont été définis dans les groupes expérimentaux.

SOD= superoxyde dismutase cytosolique ; TR= thiorédoxine réductase 1 ; GSH-Px= glutathion peroxydase.

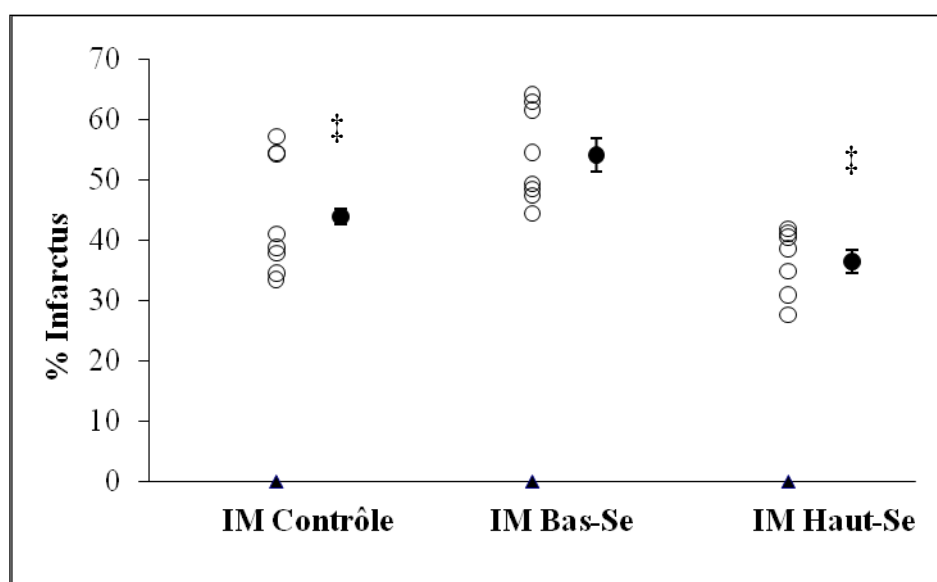


Figure 31 : Relation entre la taille de l'infarctus 8 jours après la reperfusion post-ischémique et le statut plasmatique en sélénium des animaux avant l'ischémie/reperfusion.

‡p<0,05, versus « IM Bas-Se »

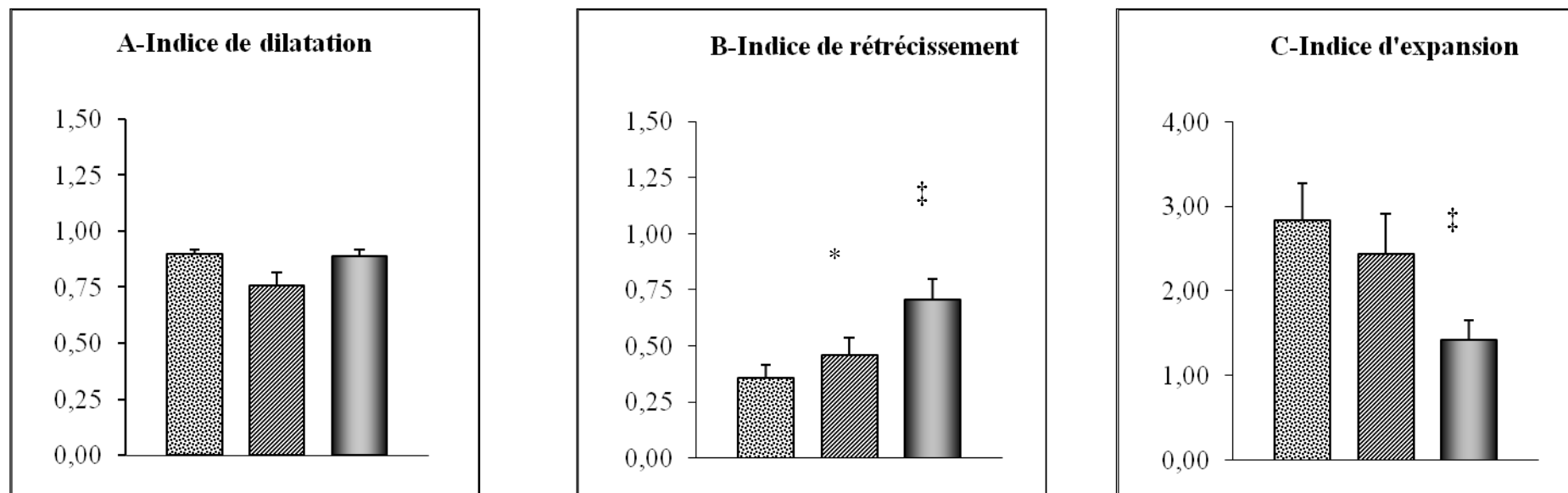


Figure 32 : Relation entre le sélénium plasmatique et les indices morphométriques cardiaques mesurés 8 jours après la reperfusion post-ischémique. : A-Indice de dilatation, B-Indice de rétrécissement et C-Indice d'expansion.

* $p < 0,05$, versus « IM Haut-Se » ; ‡ $p = 0,01$, versus « IM Bas-Se ».

- IM Bas-Se
- IM Contrôle
- IM Haut-Se

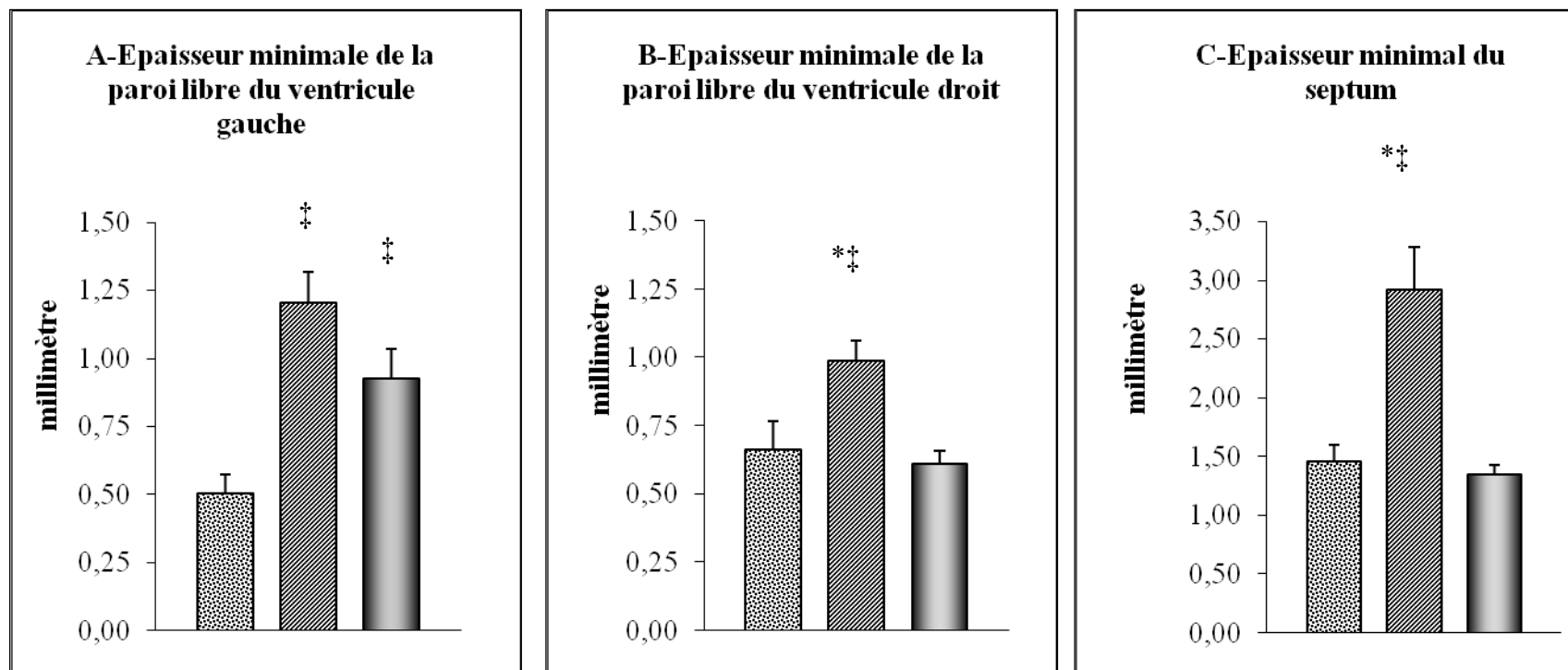


Figure 33 : Relation entre statut plasmatique en sélénium et les épaisseurs minimales des différents parois cardiaques mesurées 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

* $p < 0,01$, versus « IM Haut-Se »; ‡ $p \leq 0,01$, versus « IM Bas-Se ».

- IM Bas-Se
- IM Contrôle
- IM Haut-Se

4. DISCUSSION

L'occlusion temporaire (60 min) de l'ACG *in situ* chez le rat suivie de 8 jours de reperfusion pos-ischémique induit la nécrose de près de 40 % de la masse ventriculaire gauche qui est accompagnée d'une altération de la fonction cardiaque, de la compliance passive et des indices morphométriques tissulaires cardiaques. Ces altérations sont contemporaines d'un remaniement significatif du niveau plasmatique d'oligo-éléments essentiels tels que le Cu, le Mn et tout particulièrement le sélénium. Elles sont également accompagnées d'un déséquilibre de l'activité des principales enzymes cellulaires antiradicalaires. Dans notre modèle expérimental, le statut préischémique en sélénium apparaît comme un facteur déterminant dans le développement des effets néfastes observés.

4.1. Oligo-éléments essentiels au cours du post-infarctus

On sait depuis près de 50 ans qu'une situation de stress telle que l'IDM peut causer des variations de l'activité de diverses enzymes telle que la lactate déshydrogénase (LDH) ou la créatine kinase (CK) ou du niveau sanguins de co-facteurs d'enzymes tissulaires (Fe, Cu, Zn...). Dans ce cadre, de nombreux auteurs ont étudié le profil de certains oligo-éléments et des principales systèmes de défenses antiradicalaires dans le post-infarctus (Versiek et coll. 1975 ; Dumolard et coll. 1986 ; Venardos et coll. 2007).

Dans notre modèle expérimental, on observe que les concentrations plasmatiques en fer ont tendance à augmenter au cours du post-infarctus. Les résultats concernant le statut en fer dans le post infarctus sont contradictoires. D'une part, la thèse de Pucheu (1994) a mentionné une diminution significative du taux plasmatique en fer chez des sujets présentant un IDM, dès les premiers jours de la reperfusion par thrombolyse (Pucheu, 1994). A l'inverse, une augmentation du niveau de fer dans la circulation sanguine rapidement après un IDM a été rapportée par Altekin et coll. 2005.

Dans les conditions normales, le fer est séquestré dans des structures moléculaires. Cet élément est un composant abondant de nombreuses protéines et participe souvent à leur structure ou à l'activité catalytique d'enzymes. Les différences d'observation dans la teneur en fer après IDM pourraient être expliquées par le fait que le fer est libéré principalement par le tissu ischémique. En effet, la dégradation des protéines ainsi que la nécrose cellulaire au cours de l'ischémie et de la reperfusion post-ischémique ont été incriminés dans

l'augmentation du fer (Chevion et coll. 1993 ; Coudray et coll. 1994 ; Altekin et coll. 2005). Lors d'une IG *ex-vivo*, le fer libéré atteint rapidement un pic dès les premières minutes de la reperfusion alors que dans le cas d'une IR, le fer est libéré exclusivement durant l'ischémie et de façon retardée (Chevion et coll. 1993 ; Coudray et coll. 1994). Selon Voogd et coll. (1992), cette augmentation du fer plasmatique serait due à l'anoxie occasionnée par l'ischémie myocardique qui augmenterait la concentration en fer catalytique. Par conséquent, l'absence de modification de la teneur total en fer observée dans nos résultats semble s'expliquer par le faible échantillonnage et probablement par l'utilisation d'un modèle d'IR.

Une fois libéré, le fer peut intervenir rapidement dans des processus d'oxydoréduction moléculaires aboutissant à des lésions tissulaires. En effet, de part son rôle dans la production d'ERO *via* la réaction de Fenton (Halliwell et Gutteridge, 1990) le fer a été impliqué dans les altérations de la fonction et de la structure cardiaques associées à l'ischémie/reperfusion (Ambrosio et coll. 1991 ; Boucher et coll. 1992 ; Voogd et coll. 1992; Chevion et coll. 1993). Dans ce cadre, il joue un rôle majeur dans l'initiation et la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Gutteridge et Halliwell, 1984). Par conséquent, nos observations suggérant une augmentation de la teneur total en fer dans le post-infarctus pourrait être responsable de l'augmentation de la taille de nécrose observée dans le groupe à statut faible en sélénium. De plus, le rôle protecteur de la désférrioxamine, un chélateur du fer libre, sur la récupération de la fonction cardiaque et les incidences des arythmies à la reperfusion du myocarde ischémique (Bolli et coll. 1990 ; Ambrosio et coll. 1991 ; Pucheu 1994) suggère que l'augmentation du fer total plasmatique observée dans le post-infarctus contribuerait et/ou accentuerait les effets délétères d'un abaissement du statut en sélénium sur la fonction cardiaque et en particulier sur l'incidence des AVM dans notre modèle expérimental.

Des valeurs anormales de la cuprémie ont été décrites chez l'homme souffrant d'IDM dès 1952 par Vallee. Ces observations qu'ont été ultérieurement confirmées par d'autres auteurs (Versieck et coll. 1975 ; Dumolard et coll. 1986). Au cours de cette période, le Cu sérique augmente légèrement au bout de 2 jours, pour atteindre un maximum entre le 4ème et le 6ème jour, puis redevient normal après 3 semaines (Versieck et coll. 1975 ; Dumolard et coll. 1986). Chez l'homme, le Cu plasmatique apparaît augmenté significativement 2 jours après la reperfusion, puis retourne à sa valeur normale après plusieurs semaines (Pucheu 1994).

Le Cu sous forme de métalloenzyme participe à la réparation tissulaire (Coudray et coll. 1992). Comme le fer, la libération de cet élément peut engendrer des processus d'oxydation délétères pour le tissu *via* des réactions de type Haber-Weiss. Il est à rappeler que

le Cu libre est un puissant oxydant (Halliwell et Gutteridge 1984). L'hypothèse concernant le rôle causatif du Cu dans les lésions de reperfusion myocardique est fondée sur l'effet protecteur de l'Allopurinol chez l'homme aussi bien que chez l'animal soumis à une ischémie/reperfusion. L'allupurinol est utilisée dans le traitement de la goutte pour ses capacités à détoxifier les radicaux libres par le blocage du Cu et l'inhibition la xanthine oxydase. Celle-ci est impliquée dans la pathogénie d'une gamme étendue des maladies, et est vraisemblablement la plus importante source de radicaux libres et de lésions oxydatives durant la réoxygénation d'un tissu ischémique (Mittal et coll. 2008).

La zincémie tend à diminuer au cours de la reperfusion post-ischémique puis retrouve sa valeur normale après 5 jours de reperfusion. Ce résultat est en total accord avec les travaux de Davies et coll. (1988) qui ont fait mention d'une absence de modification de la zincémie de patients avec IDM. Il a été toutefois envisagé que la concentration sérique en Zn diminue après IDM (Versiek et coll. 1975). Lors de l'IDM, la zincémie chute dès les premières heures pour revenir à des valeurs normales en 1 semaine (Dumolard et coll. 1986). Chez l'homme, elle continue à diminuer fortement durant les premières heures de la reperfusion post-ischémique (12h), puis revient rapidement à des valeurs normales (Pucheu 1994).

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mesuré la zincémie durant les premières heures. Cette absence de modification de la zincémie semble s'expliquer également par le faible échantillonnage de nos expérimentations. D'un autre côté, puisque le Zn réagit à une prise d'aliments. Puisque nos échantillons ont été récoltés sans mis à jeun préalable des animaux, il est tout à fait probable que nos échantillons soient contaminés par la prise alimentaire.

L'implication du Zn dans les lésions de reperfusion reste assez floue. Étant un cofacteur de la SOD cytoplasmique, le statut en Zn a été positivement associé à l'activité SOD, ce qui suggère une relation étroite entre la zincémie et la production de H₂O₂ et par conséquent des ERO. Par exemple, chez des animaux déficients en Zn, Faure et coll. (1991) ont observé une augmentation de la peroxydation lipidique et de la sensibilité des lipoprotéines à l'oxydation.

Le manganèse (Mn) est capable d'activer de nombreuses enzymes et peut intervenir également dans leur structure. Par exemple, c'est un cofacteur de la SOD mitochondriale qui participe de ce fait à la protection contre les radicaux libres. L'augmentation de la concentration plasmatique en cet élément pourrait refléter une adaptation de la cellule au stress oxydatif occasionné par l'ischémie/reperfusion. Bien que nous ne l'ayons pas mesuré,

on devrait s'attendre à une élévation de l'activité SOD mitochondriale. L'élévation de la teneur plasmatique en Mn dans nos conditions expérimentales serait provoquée par la nécrose des cellules ischémiques suite à la libération de cytokines inflammatoires au niveau du tissu lésé.

Les différentes études mesurant la teneur en Mn au cours de l'IDM restent controversées. Manthey et coll. (1981) ont trouvé une augmentation de sa concentration, alors que l'étude de Arnaud et coll. (1996) n'at rien observé.

Le niveau plasmatique en sélénium au cours des premiers jours de la reperfusion diminue significativement comparé à la valeur préischémique. Nos résultats confirment alors notre hypothèse que l'IDM est capable d'engendrer une diminution du niveau plasmatique en sélénium. Les faibles concentrations en sélénium pourraient dans ce cas expliquer en partie les lésions de reperfusion dues aux ERO. En effet, une corrélation négative a été mise en évidence entre le taux de MDA et celui de sélénium plasmatique (Korpela et coll. 1989). Le sélénium fait partie intégrante de la principale enzyme antiradicalaire, la GSH-Px ; une diminution de son statut individuel conduirait à un affaiblissement de la capacité antioxydante tissulaire. Dans ce cadre, une corrélation positive entre le niveau sanguin en sélénium et l'activité GSH-Px a été démontrée (Salonen et coll. 1982 ; Kok et coll 1989). Cette diminution du statut en sélénium a été expliquée par l'utilisation accrue des sélénoenzymes lors des situations de stress comme l'ischémie/reperfusion myocardique.

4.2. Capacité antioxydante tissulaire cardiaque à 8 jours post-reperfusion

La baisse d'activité SOD observée au cours du post-infarctus a été déjà mentionnée dans la littérature et semble être due principalement à la nécrose tissulaire cardiaque induite par l'ischémie/reperfusion. En effet, une deuxième vague d'apoptose a été rapportée autour de cette période. Nous avons vu précédemment que dans ce modèle expérimental, l'induction d'un IDM a été associée à une augmentation significative de la teneur cardiaque en TNF- α , principal médiateur de la mort cellulaire. D'un autre côté, la baisse du niveau d'activité de la SOD pourrait être expliquée par le fait que cette enzyme a une demi-vie relativement courte (4-5 min) (Inoue, 1985) et que l'IDM diminue le Zn plasmatique.

Parmi les différentes formes radicalaires dérivées de l'oxygène dont l'implication dans le syndrome de reperfusion est considérée, il est admis que c'est le radical \cdot OH qui, du fait de son haut potentiel oxydant et de sa très grande réactivité, peut exercer les effets cytotoxiques

les plus marqués (Bolli et coll. 1991). La diminution de l'activité SOD se traduirait alors par une baisse de la production de H_2O_2 et par conséquent de $l'\cdot OH$ (Halliwell et Gutteridge, 1984). Toutefois, cet effet est concomitant d'une diminution de l'activité catalasique. Ces deux effets contribueraient à l'augmentation de la production des ERO dans le post-infarctus et de leurs effets cytotoxiques. Par exemple, une corrélation positive ($r=0,71$) a pu être mise en évidence entre le pourcentage de récupération de la PDev et l'activité catalase à la fin de la reperfusion (30 min) du tissu ischémique (20 min) *ex-vivo* (Boucher et coll. 1998).

L'observation d'une augmentation de l'activité GSH-Px et TR cardiaque (bien que non significative) sous l'effet de l'ischémie/reperfusion, suggère une augmentation de l'activité radicalaire après reperfusion post-ischémique. Ces résultats sont en accord avec la littérature mettant en évidence une réponse adaptative de la GSH-Px en réponse au stress oxydatif chez le rat (Ganther et coll. 1976 ; Hill et coll. 1997). Les travaux de Pucheu (1994) ont montré qu'au cours d'une ischémie/reperfusion myocardique, la carence en Cu, en Mn, en Zn ou sélénium, ne modifie ni la fonction cardiaque ni l'activité de la SOD cardiaque *ex-vivo*. En revanche, l'activité GSH-Px cytosolique et mitochondriale apparaissait significativement diminuée par une carence en sélénium (Pucheu 1994). Dans ces études, le tissu cardiaque présente une vulnérabilité accrue aux altérations structurales. Ces observations suggèrent que la diminution plasmatique en sélénium serait postérieure à la modification de l'activité des sélénoenzymes et que l'augmentation de l'activité de ces enzymes contribuerait à l'utilisation du pool cardiaque en sélénium.

4.3. Relation entre statut en sélénium et taille infarctus

Les résultats concernant les facteurs de risques d'infarctus chez des sujets à faible statut en sélénium restent très controversés. Alissa et coll. (2003) n'ont pas pu mettre en évidence une relation entre le niveau de sélénium sérique et les risques d'infarctus. A l'inverse, Flores-Matéo et coll. (2006) ont démontré une corrélation négative entre le statut en sélénium et l'incidence d'événements ischémiques. Nos résultats démontrent pour la première fois un lien entre le statut préischémique en sélénium et les conséquences néfastes de l'ischémie/reperfusion. Plus le statut en sélénium est élevé, moins les altérations post-ischémique (taille de la nécrose et géométrie cardiaque) sont sévères. Puisque nous avons montré que le sélénium administré oralement à raison de 1,5 mg/kg de nourriture induit une limitation de la teneur en TNF- α au niveau du myocarde, ces améliorations évaluées à 8 jours

post-infarctus pourraient être une des conséquences d'une inhibition des voies de production et de signalisation du TNF- α .

D'un autre côté, nous avons vu que des modifications des taux plasmatiques de certains oligo-éléments essentiels apparaissent après la reperfusion post-ischémique. Leur implication est donc plus qu'envisageable. Des régimes mono-carencés en ces oligo-éléments sont capables d'augmenter la susceptibilité fonctionnelle et structurale du cœur de rat vis-à-vis d'une séquence d'ischémie/reperfusion avec notamment une diminution du pourcentage de récupération de la Pdev et du rythme sinusal et le développement d'altérations ultrastructurales caractéristiques des lésions ischémiques.

5. CONCLUSION

Cette étude nous a permis de confirmer l'établissement d'un stress oxydant dans notre modèle d'infarctus du myocarde. Un bouleversement des statuts plasmatiques en oligo-éléments essentiels tels que le cuivre, le manganèse et le sélénium est observé. En conséquence, une réponse adaptative en termes d'activité des principales protéines de défenses antiradicalaires a pu être mise en évidence, adaptation qui reste insuffisante cependant, pour limiter la propagation des lésions produites par les ERO. Les résultats de cette partie de l'étude montrent que l'IDM en lui-même induit une baisse significative en sélénium au cours de la phase précoce du post-infarctus. Cette modification du statut en sélénium au cours de la phase précoce du post-infarctus semble être déterminante pour l'issue de l'IDM. Nos résultats démontrent pour la première fois un lien entre le statut préischémique en sélénium et les altérations post-infarctus dont la taille de nécrose et la géométrie cardiaque.

Conclusion générale et
perspectives

Considéré initialement comme toxique, le sélénium, est aujourd'hui, reconnu comme un oligo-élément essentiel pour l'organisme. Depuis près de 50 ans, de nombreuses études expérimentales et cliniques ont été consacrées au rôle du statut en sélénium dans l'incidence et la sévérité des maladies cardiovasculaires. Dans le cadre de notre travail de recherche, nous nous sommes intéressés aux effets de l'apport nutritionnel en sélénium sur la vulnérabilité du tissu cardiaque à l'ischémie et à la reperfusion post-ischémique. Notre objectif a été (i) d'évaluer les effets des apports en sélénium alimentaire sur l'évolution des altérations cardiovasculaires à la suite d'un IDM pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque, (ii) d'en préciser les mécanismes cellulaires.

En utilisant un modèle classique d'IR sur cœur isolé perfusé de rat, pour étudier les AR, nous avons confirmé qu'une supplémentation alimentaire en sélénium (1,5 mg/kg de régime) maintenue pendant de 10 semaines limite la sévérité et l'incidence des troubles du rythme cardiaque, en parallèle avec une augmentation du taux plasmatique en sélénium et une amélioration de l'activité antioxydante de la GSH-Px. Nous avons pu montrer que cette limitation est associée à une normalisation de la teneur en Cx43 non phosphorylées dans le tissu cardiaque ischémique. Cette déphosphorylation est proportionnelle à l'intensité et à la sévérité du stress ischémique. Elle contribuerait aux anomalies de l'excitabilité myocardique, responsables de l'apparition des AVM.

Nous avons ensuite utilisé un modèle d'infarctus du myocarde induit chez le rat par ligature temporaire de l'ACG. Ce modèle reproduit les altérations de la fonction et de la morphologie cardiaques post-infarctus. Dans un premier temps, l'occlusion de l'ACG (60 min) a provoqué des AVM ischémiques responsables de près de 50% de la mortalité des animaux. Une élévation du statut en sélénium semble diminuer le risque de mortalité liée aux AVM observées durant les 30 premières minutes et est accompagnée d'une réduction de la préservation de la déphosphorylation de la Cx43 observée à 8 jours post-infarctus. Dans un deuxième temps, la mesure de la taille de nécrose à 8 jours post-infarctus a montré que cette élévation du statut en sélénium préalablement à l'induction de l'IDM permet de diminuer significativement la taille de nécrose. Nos résultats ont confirmé l'effet cardioprotecteur du sélénium dans l'ischémie/reperfusion *in-vivo*. Ils montrent clairement que l'augmentation du statut en sélénium est associée à l'inhibition de la production de TNF- α cardiaque et améliore les indices morphométriques caractérisant le remodelage cardiaque au cours du post-infarctus. Les effets cardioprotecteurs du sélénium pourraient être le résultat de la diminution de TNF- α cardiaque suite à l'augmentation concomitante de l'activité des enzymes antioxydantes. Des

études complémentaires seront nécessaires pour établir exactement le lien entre le stress oxydant et la production de TNF- α . Si le sélénium potentialise la relaxation endothélium-dépendante de l'aorte isolé, aucun effet sur la réactivité vasculaire post-ischémique n'a, en revanche, été observé.

La dernière partie de notre travail a eu pour objectif de vérifier l'importance du statut en sélénium dans l'évolution de l'IDM. Dans un premier temps, nous avons montré que l'IDM en lui-même est capable de réduire significativement la teneur plasmatique en sélénium dès le premier jour du post-infarctus. Cette modification est associée à un remaniement significatif du niveau plasmatique d'autres oligo-éléments essentiels tels que le cuivre et le manganèse au cours de la reperfusion et de la capacité antioxydante cellulaire à 1 semaine post-infarctus. L'abaissement du statut en sélénium en préischémique pourrait exagérer ces modifications et expliquer les effets délétères observés sur la fonction et la structure cardiaque. Dans cette partie, nous avons comparé la taille de nécrose en fonction du statut en sélénium. Nos résultats mettent en évidence une relation étroite entre le statut préischémique en sélénium et les altérations morphologiques post-infarctus.

Les résultats de notre travail suggèrent l'intérêt d'un ajustement de l'apport en sélénium, et par conséquent de son statut, à des valeurs nutritionnelles $> 50\mu\text{g}/\text{jour}$, en thérapeutique préventive des MCV. Bien que la transposition directe de cette méthode ne soit applicable chez l'homme, nous pouvons envisager d'utiliser le sélénium en prévention secondaire de l'IDM. Il serait intéressant de voir si la modification du régime à un stade précoce du post-infarctus peut retarder l'évolution de l'insuffisance cardiaque. A plus court terme, il serait utile de poursuivre notre étude sur une durée plus longue afin de la compléter. Dans tous les cas, une approche génétique permettant d'étudier les gènes cibles d'une modulation du statut en sélénium pourrait permettre de préciser les gènes impliqués dans les effets de cet oligo-élément.

Liste des références
bibliographiques

- Akar JG, Akar FG.**(2007) Regulation of ion channels and arrhythmias in the ischemic heart. *J Electrocardio*; 40(6 Suppl):S37-41.]
- Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B.** (2005) The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest*; 115(12):3527-35. Epub 2005 Nov 10.]
- Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA.** (2003) The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Med Sci Monit*;9(1):RA9-18.]
- Altakin E, Coker C, Şişman AR, Onvural B, Kuralay F, Kırımli O.** (2005) The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes. *J Trace Elem Med Biol*.;18(3):235-42.]
- Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT.** (1987) Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation*.;76(4):906-15.]
- Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, Schüttler J, Gärtner R.**(2007)Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized,placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med*;35(1):118-26.]
- Anversa P, Loud AV, Levicky V, Guideri G.** (1985) Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *Am J Physiol*; 248(6 Pt 2):H876-82]
- Arnaud J, Boulard P, Denis B, Favier AE.** (1996) Plasma and erythrocyte manganese concentrations. Influence of age and acute myocardial infarction. *Biol Trace Elem Res*. Summer;53(1-3):129-36.]
- Arnér ES, Zhong L, Holmgren A.** (1999) Preparation and assay of mammalian thioredoxin reductase. *Meth Enzymol* 300, 226-239]

Barandier C. (1998) POTENTIEL THERAPEUTIQUE DU MANGANESE ET DE L'UN DE SES DERIVES SYNTHETIQUES SUR LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE. Thèse N°1998GRE10238, Grenoble I. 322p.]

Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kleber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. (2000) Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin 43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res*. 87:656–62. 94 (7)]

Becker LB. (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion

physiology. *Cardiovasc Res*; 61(3):461-70.]

Beers RF, Sizer IW. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem*; 195(1):133-40.]

Behne D, Hilmert H, Scheid S, Gessner H, Elger W. (1988) Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim Biophys Acta*; 966(1):12-21.]

Bertonneche C, Sulpice T, Boucher F, Gouraud L, de Leiris J, O'Connor SE, Herbert JM, Janiak P. (2004) New insights into the pathological role of TNF α in early cardiac dysfunction and subsequent heart failure after infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 287(1):H340-50.]

Blot WJ. (1993) Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst*; 85: 1483-1498.]

Bolli R. (1991) Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther.* Mar;5 Suppl 2:249-68.]

Bolli R, Marbán E. (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*; 79(2):609-34.]

Boucher F, Pucheu S, Coudray C, Favier A, de Leiris J. (1992) Evidence of cytosolic iron release during post-ischaemic reperfusion of isolated rat hearts. Influence on spin-trapping experiments with DMPO. *FEBS Lett.*;302(3):261-4.]

Boucher F, Tanguy S, Besse S, Tresallet N, Favier A, de Leiris J. (1998) Age-dependent changes in myocardial susceptibility to zero flow ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts: relation to antioxidant status. *Mech Ageing Dev.* Jul 15;103(3):301-16.]

Bricknell OL, Opie LH. (1978) Effects of substrates on tissue metabolic changes in the isolated rat heart during underperfusion and on release of lactate dehydrogenase and arrhythmias during reperfusion. *Circ Res.* 43(1):102-15.]

Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. (2003) Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid Redox Signal.* 5(2):205-15.]

Brömme HJ, Holtz J. (1996) Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem.*;163-164:261-75.]

Buja LM, Parkey RW, Dees JH, Stokely EM, Harris RA Jr, Bonte FJ, Willerson JT. (1975) Morphologic correlates of technetium-99m stannous pyrophosphate imaging of acute myocardial infarcts in dogs. *Circulation.* 52(4):596-607.]

Burk RF, Hill KE. Regulation of selenoproteins. *Annu Rev Nutr.* 1993;13:65-81.]

- Cai H**, Harrison DG. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*; 87(10):840-4.]
- Cao YZ**, Maddox JF, Mastro AM, Scholz RW, Hildenbrandt G, Reddy CC. (1992) Selenium deficiency alters the lipoxygenase pathway and mitogenic response in bovine lymphocytes. *J Nutr*; 122(11):2121-7.]
- Ceconi C**, Boraso A, Cargnoni A, Ferrari R. (2003) Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? *Arch Biochem Biophys* ; 420(2):217-21.]
- Chadwick CC**, Saito A, Fleischer S. (1990) Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87(6):2132-6.]
- Chen G**, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1634-5.]
- Chevion M**, Jiang Y, Har-El R, Berenshtein E, Uretzky G, Kitrossky N. (1993) Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;90(3):1102-6.]
- Christ GJ**, Spray DC, el-Sabban M, Moore LK, Brink PR. (1996) Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res*.;79(4):631-46.]
- Clements-Jewery H**, Hearse DJ, Curtis MJ. (2005) Phase 2 ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction: a neglected target for therapeutic antiarrhythmic drug development and for safety pharmacology evaluation. *Br J Pharmacol*. 145(5):551-64.]
- Coetzee WA**, Enous R, Opie LH. (1990) Trimetazidine: effects on delayed afterdepolarizations (DADs) and upstroke velocity of the action potential. *Cardiovasc Drugs Ther*; 4 Suppl 4:806-7.]
- Cohen RA**. (1993) Pathways controlling healthy and diseased arterial smooth muscle. *Am J Cardiol*.;72(8):39C-46C; discussion 46C-47C.]
- Combs GF**, **Combs SB**. (1986) The role of selenium in nutrition. New York: Academic press, Inc: 463-525.]
- Conger JD**, Weil JV. (1995) Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investig Med*; 43(5):431-42.]
- Contreras JE**, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MV. (2003) Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;100(20):11388-93.]

Coudray C, Hida H, Boucher F, Tirard V, de Leiris J, Favier A. (1996) Effect of selenium supplementation on biological constants and antioxidant status in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 10(1)

Coudray C, Pucheu S, Boucher F, Arnaud J, de Leiris J, Favier A. (1994) Effect of ischemia/reperfusion sequence on cytosolic iron status and its release in the coronary effluent in isolated rat hearts. *Biol Trace Elem Res*; 41(1-2):69-75.]

Curtis MJ, Pugdley MK, and Walker MJ. (1993) Endogenous chemical mediators of ventricular arrhythmias in ischemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 27(5) :703-719.]

Curtis MJ, Walker MJ. (1988) Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res.* Sep;22(9):656-65.]

Darley-Usmar V, Halliwell B. (1996) Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res*; 13(5):649-62.]

de Lorgeril M, Salen P. (2006) Selenium and antioxidant defenses as major mediators in the development of chronic heart failure. *Heart Fail Rev.*;11(1):13-7.]

Delahaye F, Bory M, Cohen A, Danchin N, de Gevigney N, Dellinger A, Fraboulet J.-Y, Gayet J.-L, Guize L, Iung B, Mabo P, Monpère C, Steg P.-G et Thomas D. (2001) Recommandations de la Société française de cardiologie concernant la prise en charge de l'infarctus du myocarde après la phase aiguë. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 94 (7).]

Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*; 82(1):47-95.]

Dumolard L, Arnaud J, Veyrat B, Favier A. (1986) [Serum trace elements and myocardial infarction] *Ann Biol Clin (Paris)*; 44(3):217-23.]

Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. (1979) Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med*; 300(2):57-62.]

Elenes S, Martinez AD, Delmar M, Beyer EC, Moreno AP. (2001) Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys J.* 81(3):1406-18.]

Erlebacher JA, Richter RC, Alonso DR, Devereux RB, Gay WA Jr. (1985) Early infarct expansion: structural or functional? *J Am Coll Cardiol*; 6(4):839-44.]

Evans P, Halliwell B. (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr*; 85 Suppl 2:S67-74.]

-
- Fabiani** JN, Deloche A, Camilleri JP, Joseph D, Carpentier A, Dubost C. (1977) [Protocol of study of acute myocardial ischemia in the rat (author's transl)] *Ann Chir*; 31(5):167-71.]
- Farber** JL. (1990) The role of calcium in lethal cell injury. *Chem Res Toxicol*; 3(6):503-8.]
- Faure** P, Roussel AM, Richard MJ, Foulon T, Gros Lambert P, Hadjian A, Favier A. (1991) Effect of an acute zinc depletion on rat lipoprotein distribution and peroxidation. *Biol Trace Elem Res*;28(2):135-46.]
- Feldman** AM, Combes A, Wagner D, Kadakomi T, Kubota T, Li YY, McTiernan C. (2000) The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1;35(3):537-44.]
- Ferrari** R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, Pardini A, Caradonna E, Visioli O. Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. *Circulation*. 1990 Jan;81(1):201-11.]
- Ferrari** R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, Visioli O. (1998) Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol* ;82(5A):2K-13K]
- Feuvray** D. (1981) Structural, functional, and metabolic correlates in ischemic hearts: effects of substrates. *Am J Physiol*; 240(3):H391-8.]
- Figuroa** XF, Isakson BE, Duling BR. (2004) Connexins: gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology (Bethesda)*;19:277-84.]
- Flohé** L, Brigelius-Flohé R, Saliou C, Traber MG, Packer L. (1997) Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free Radic Biol Med*;22(6):1115-26.]
- Flohé** L, Günzler WA. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 105:114-21.]
- Flores-Mateo** G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, Guallar E. (2006) Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. Oct;84(4):762-73.]
- Forceville** X, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P.(1998) Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*; 26(9):1536-44.]
- Frangogiannis** NG. (2006) The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*.;8(11-12):1907-39.]
- Furchgott** RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989 Jul;3(9):2007-18.]
-

- Gabriels JE, Paul DL.** (1998) Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res.*;83(6):636-43.]
- Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Rodriguez-Sinovas A, Mirabet M.** (2002) Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.*;55(3):456-65.]
- Giordano FJ.** (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* ; 115(3):500-8.]
- Goldhaber JJ.** (1996) Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol. Sep*;271(3 Pt 2):H823-33.]
- Granger DN.** (1988) Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.*;255(6 Pt 2):H1269-75.]
- Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, et al.** Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol.* 1995;269:R229–R235.]
- Gutstein DE, Morley GE, Vaidya D, Liu F, Chen FL, Stuhlmann H, Fishman GI.** (2001) Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction. *Circulation*; 104(10):1194-9.]
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ.** (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* ;271(8):4138-42]
-
- Haefliger JA, Nicod P, Meda P.** (2004) Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res*; 62(2):345-56.]
- Hagar JM, Hale SL, Kloner RA.** (1991) Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res.* 68(1):61-8.]
- Halliwell B, Gutteridge JM.** (1984) Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet.*;1(8391):1396-7.]
- Halliwell B, Gutteridge JM.** (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*;186:1-85]
- Hampel G, Watanabe K, Weksler BB, Jaffe EA.** (1989) Selenium deficiency inhibits prostacyclin release and enhances production of platelet activating factor by human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.*;1006(2):151-8.]

Hathcock JN. (1997) Vitamins and minerals: efficacy and safety. *Am J Clin Nutr*;66(2):427-37.]

Hearse DJ, De Leiris. (1979) *Ezymes in cardiology: diagnosis and research.* Chichester. New York. Brisbane. Toronto, John Wiley & Sons.]

Hearse DJ. (1988) The protection of the ischemic myocardium: surgical success v clinical failure? *Prog Cardiovasc Dis*; 30(6):381-402.]

Hensrud DD, Heimbürger DC, Chen J, Parpia B. (1994) Antioxidant status, erythrocyte fatty acids, and mortality from cardiovascular disease and Keshan disease in China. *Eur J Clin Nutr*; 48(7):455-64.]

Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: friend and foe. (1984) The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.*;16(11):969-85.]

Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. (1975) Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*;56(4):978-85.]

Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB, McGowan BS, Chan TO, Feldman AM. (2004) Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy. *Circulation*; 109(15):1892-7. Epub 2004 Mar 29.]

Hill MF, Singal PK. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation.* 1997 Oct 7;96(7):2414-20.]

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*; 377(6546):239-42]

Hutchins GM, Bulkley BH. (1978) Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.*;41(7):1127-32]

Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. (1987) Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. *J Biol Chem.*;262(20):9569-73.]

Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. (1999) Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*; 99(11):1492-8.]

Jamaluddin M, Wang S, Boldogh I, Tian B, Brasier AR. (2007) TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cell Signal*; 19(7):1419-33.]

Janse MJ. (1991) What a clinician needs to know about the mechanisms of action of antiarrhythmic drugs. *Clin Cardiol*. 14(1):65-7.]

Jennings RB, Ganote CE. (1974) Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* 35 Suppl 3:156-72]

Jennings RB, **Reimer** KA.(1983) Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation*; 68(2 Pt 2):I25-36.]

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. (1960) Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* ; 70:68-78]

Jeyaraman M, Tanguy S, Frandrich R, Lukas A, and Kardami E. (2003) Ischemia-induced dephosphorylation of cardiomyocyte Cx43 is reduced by okadaic acid and caliculin A but not Fostriecin. *Mol Cell Biochem*. 242 :129-134.]

Jongsma HJ, **Wilders** R. (2000) Gap junctions in cardiovascular disease. *Circ Res*.;86(12):1193-7.]

Kaeffler N, Richard V, Francois A, Lallemand F, Henry JP, Thuillez C. (1996) Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats. *Am J Physiol*; 271(3 Pt 2):H842-9.]

Kalcheva N, Qu J, Sandeep N, Garcia L, Zhang J, Wang Z, Lampe PD, Suadicani SO, Spray DC, Fishman GI. (2007) Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis in a murine model of oculodentodigital dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 18;104(51):20512-6. Epub 2007 Dec 11.]

Kalra D, Sivasubramanian N, Mann DL. (2002) Angiotensin II induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation*.;105(18):2198-205.]

Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, Pennell DJ, Fox K, Pepper J, Poole-Wilson PA, Severs NJ. (1998) Downregulation of immunodetectable connexin43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle. *Circulation*; 97(7):651-60.]

Kayanoki Y, Fujii J, Islam KN, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N. (1996) The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. *J Biochem*;119(4):817-22.]

- Keith M**, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, Jeejeebhoy KN. (1998) Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* ; 31(6):1352-6]
- Khaper N**, Singal PK. (2001) Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *J Am Coll Cardiol*; 37(5):1461-6.]
- Kléber AG**. (1987) Conduction of the impulse in the ischemic myocardium--implications for malignant ventricular arrhythmias. *Experientia*;43(10):1056-61.]
- Kloner RA**, Ganote CE, Jennings RB. (1974) The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest*; 54(6):1496-508.]
- Køber L**, Torp-Pedersen C, Pedersen OD, Høiberg S, Camm AJ. (1996) Importance of congestive heart failure and interaction of congestive heart failure and left ventricular systolic function on prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*.;78(10):1124-8.]
- Kok FJ**, Hofman A, Witteman JC, de Bruijn AM, Kruyssen DH, de Bruin M, Valkenburg HA. Decreased selenium levels in acute myocardial infarction. *JAMA*. 1989 Feb 24;261(8):1161-4.]
- Koller LD**, Exon JH. (1986) The two faces of selenium-deficiency and toxicity--are similar in animals and man. *Can J Vet Res*: 50(3):297-306.]
- Kontos HA**, Wei EP, Povlishock JT, Dietrich WD, Magiera CJ, Ellis EF. (1980) Cerebral arteriolar damage by arachidonic acid and prostaglandin G2. *Science*; 209(4462):1242-5.]
- Korpela H**, Kumpulainen J, Jussila E, Kemilä S, Kääriäinen M, Kääriäinen T, Sotaniemi EA. Effect of selenium supplementation after acute myocardial infarction. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1989 Aug;65(2):249-52.]
- Krebs HA** et Henseleit K. (1932) Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe Seyler's Z*. 210: 33-66.]
- Ku DD**. (1982) Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science*. 5;218(4572):576-8.]
- Kurrelmeyer KM**, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. (2000) Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(10):5456-61.]
- Kutala VK**, Khan M, Angelos MG, Kuppusamy P. (2007) Role of oxygen in postischemic myocardial injury. *Antioxid Redox Signal*; 9(8):1193-206.]

Kwak BR, Veillard N, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Chanson M, Mach F. (2003) Reduced connexin43 expression inhibits atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.*;107(7):1033-9.]

Lafont A, Marwick TH, Chisolm GM, Van Lente F, Vaska KJ, Whitlow PL. (1996) Decreased free radical scavengers with reperfusion after coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*; 131(2):219-23.]

Lampe PD, Cooper CD, King TJ, Burt JM.(2006) Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci.* 119(Pt 16):3435-42.]

Langendorff O. (1895) Untersuchungen am überlebenden Säugertierhertzen. *Plüg. Arch.* 61: 291-332.]

Lee JJ, Olmos L, Vanhoutte PM. (1996) Recovery of endothelium-dependent relaxations four weeks after ischemia and progressive reperfusion in canine coronary arteries. *Proc Assoc Am Physicians*; 108(5):362-7.]

Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. (1991) Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J*; 5(7):2029-34.]

Lerner DL, Beardslee MA, Saffitz JE. (2001) The role of altered intercellular coupling in arrhythmias induced by acute myocardial ischemia. *Cardiovasc Res.* 50(2):263-9.]

Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF Jr, Vita JA. (1996) Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation.*;93(6):1107-13.]

Levy JB, Jones HW, Gordon AC. Selenium deficiency, reversible cardiomyopathy and short-term intravenous feeding. *Postgrad Med J.* 1994 Mar;70(821):235-6.]

Liao Y, Day KH, Damon DN, Duling BR. (2001) Endothelial cell-specific knockout of connexin 43 causes hypotension and bradycardia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98(17):9989-94.]

Lin JH, Yang J, Liu S, Takano T, Wang X, Gao Q, Willecke K, Nedergaard M. (2003) Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J Neurosci.* 23(2):430-41.]

Liu F, Gutstein DE. (2002) The cardiac gap junction: a potential therapeutic target in the treatment of heart disease. *Mt Sinai J Med.*;69(6):421-4.]

Lu X, Liu SY, Man RY.(1994) Enhancement of endothelium dependent relaxation in the rat aortic ring by selenium supplement.*Cardiovasc Res.*;28(3):345-8.]

Luke RA, Saffitz JE. (1991) Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest*; 87(5):1594-602.]

Luo XM, Wei HJ, Yang CL, Xing J, Liu X, Qiao CH, Feng YM, Liu J, Liu YX, Wu Q, et al. (1985) Bioavailability of selenium to residents in a low-selenium area of China. *Am J Clin Nutr*;42(3):439-48.]

Lüscher TF. (1992) Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J*.;13 Suppl D:50-5.]

Maddox JF, Aherne KM, Reddy CC, Sordillo LM. (1999) Increased neutrophil adherence and adhesion molecule mRNA expression in endothelial cells during selenium deficiency. *J Leukoc Biol*.;65(5):658-64.]

Maddox JF, Reddy CC, Eberhart RJ, Scholz RW. (1991) Dietary selenium effects on milk eicosanoid concentration in dairy cows during coliform mastitis. *Prostaglandins*.;42(4):369-78.]

Maggee RJ et James BD. (1996) Selenium. In handbook on metals in clinical and analytical chemistry. Marcel Dekker, Inc; New York.Basel.Hong Kong: 551-562.]

Malik AB, Lo SK. (1996) Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol Rev*; 48(2):213-29.]

Mankad PS, Amrani M, Rothery S, Severs NJ, Yacoub MH. (1997) Relative susceptibility of endothelium and myocardial cells to ischaemia-reperfusion injury. *Acta Physiol Scand*; 161(1):103-12.]

Manthey J, Stoepler M, Morgenstern W, Nüssel E, Opherk D, Weintraut A, Wesch H, Kübler W. (1981) Magnesium and trace metals: risk factors for coronary heart disease? Association between blood levels and angiographic findings. *Circulation*.;64(4):722-9.]

Marcus RW. (1993) Myopathy and cardiomyopathy associated with selenium deficiency: case report, literature review, and hypothesis. *Md Med J*.;42(7):669-74.]

Marin J, Rodriguez-Martinez MA. (1995) Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* ; 15(4):279-307]

Marklund S. (1976) Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 251(23):7504-7.]

McCord JM. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*; 312(3):159-63.]

- McCully** JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S. (2004) Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 286(5):H1923-35. Epub 2004 Jan 8.]
- McKay** RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. (1986) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*; 74(4):693-702]
- McKenzie** RC, Arthur JR, Beckett GJ. (2002) Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxid Redox Signal.*;4(2):339-51.]
- Mickelson** JK, Simpson PJ, Lucchesi BR. (1990) Ischemic heart disease: pathophysiology and pharmacology management. In: M. Antonaccio, "cardiovascular pharmacology", Raven Press, New York (3rd edition): 293-340.]
- Miura** T, Ohnuma Y, Kuno A, Tanno M, Ichikawa Y, Nakamura Y, Yano T, Miki T, Sakamoto J, Shimamoto K. Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jan;286(1):H214-21. Epub 2003 Sep 18.]
- Moe** GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q. (2004) In vivo TNF- α inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Oct;287(4):H1813-20. Epub 2004 Jun 17.]
- Moro** C, Jouan MG, Rakotavao A, Toufektsian MC, Ormezzano O, Nagy N, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F. (2007) Delayed expression of cytokines after reperfused myocardial infarction: possible trigger for cardiac dysfunction and ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(5):H3014-9.]
- Murphy** E, Steenbergen C. (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*; 88(2):581-609.] **Musil** **LS**, **Goodenough** **DA**. (1993) Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell.*;74(6):1065-77.]
-
- Nakamura** K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M. (1998) Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. *Circulation.*;98(8):794-9.]

Nathan C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature*; 420(6917):846-52.] **Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, et al.** (1995) Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*; 92:748 –755.]

Nève J. (1991) Physiological and nutritional importance of selenium. *Experientia*. Feb 15; 47(2):187-93.]

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 2004 Jun 25;94(12):1543-53.]

Nicholson BJ. (2003) Gap junctions - from cell to molecule. *J Cell Sci* ; 116(Pt 22):4479-81.]

Nishizuka Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*; 9(7):484-96.]

Nordberg J, Arnér ES. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*. Dec 1;31(11):1287-312.]

Oldfield JE. (1987) The two faces of selenium. *J Nutr*: 2002-2008.]

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. (1998) Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*; 98(2):149-56.]

Opie LH. (1991) Postischemic stunning--the case for calcium as the ultimate culprit. *Cardiovasc Drugs Ther* ; 5(5):895-9.]

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. (2006) Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*.;367(9507):356-67.]

Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*. 9(7):775-806.]

Park HS, Huh SH, Kim Y, Shim J, Lee SH, Park IS, Jung YK, Kim IY, Choi EJ. (2000) Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism. *J Biol Chem*. 24;275(12):8487-91.]

Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. (2005) SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*;437(7059):759-63.]

Paul DL. (1986) Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol*; 103(1):123-34.]

Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, Innis JW, Dinulos MB, Christian C, Hannibal MC, Jabs EW. (2003) Connexin 43 (GJA1) mutations

cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.*72(2):408-18. Epub 2002 Nov 27.]

Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM. (1990) Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation.*;81(6):1921-7.]

Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. (1997) Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. *Circulation*; 95(4):988-96.]

Peters NS, Wit AL. (1998) Myocardial architecture and ventricular arrhythmogenesis. *Circulation*; 97(17):1746-54.]

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. (1987) Hemodynamic benefits and prolonged survival with long-term captopril therapy in rats with myocardial infarction and heart failure. *Circulation.*;75(1 Pt 2):I149-55.]

Poelzing S, Rosenbaum DS. (2004) Nature, significance, and mechanisms of electrical heterogeneities in ventricle. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 280(2):1010-7.]

Poltronieri R, Cevese A, Sbarbati A. (1992) Protective effect of selenium in cardiac ischemia and reperfusion. *Cardioscience*; 3(3):155-60.]

Prince RC, Gailer J, Gunson DE, Turner RJ, George GN, Pickering IJ. (2007) Strong poison revisited. *J Inorg Biochem*; 101(11-12):1891-3. Epub 2007 Jun 13.]

Pucheu S. (1994) Contribution a l'etude des manifestations physiopathologiques liees au stress oxydatif intervenant lors de la reperfusion du myocarde ischemique : role des oligoelements et essais de protection par des molecules antioxydantes / sylvie pucheu ; sous la direction de j. de leiris. Thèse N° : 1994GRE10180. 258 p

Quillen JE, Sellke FW, Brooks LA, Harrison DG. (1990) Ischemia-reperfusion impairs endothelium-dependent relaxation of coronary microvessels but does not affect large arteries. *Circulation.*;82(2):586-94.]

Rakotovo A, Tanguy S, Toufektsian MC, Berthonneche C, Ducros V, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F. (2005) Selenium status as determinant of connexin-43 dephosphorylation in ex vivo ischemic/reperfused rat myocardium. *J Trace Elem Med Biol.*;19(1):43-7.]

Rannem T, Ladefoged K, Hylander E, Christiansen J, Laursen H, Kristensen JH, Linstow M, Beyer N, Liguori R, Dige-Petersen H, et al. (1995) The effect of selenium supplementation

on skeletal and cardiac muscle in selenium-depleted patients. JPEN J Parenter Enteral Nutr ; 19(5):351-5.]

Rayman MP. (2000) The importance of selenium to human health. Lancet. 356 (9225):233-41.]

Rezkalla SH, Kloner RA.(2002)No-reflow phenomenon. Circulation; 105(5):656-62.]

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R,Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von Maltzahn J, Hofmann A, Reining S, Eiberger B,Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK. (2007) Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. Nature.;450(7171):819-24.]

Rubanyi GM. (1988) Vascular effects of oxygen-derived free radicals. Free Radic Biol Med; 4(2):107-20]

Rueckschloss U, Duerschmidt N, Morawietz H. (2003) NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. Antioxid Redox Signal. 5(2):171-80.]

Sáez JC, Retamal MA, Basilio D, Bukauskas FF, Bennett MV. (2005) Connexin-based gap junction hemichannels: gating mechanisms. Biochim Biophys Acta.;1711(2):215-24.]

Salonen JT, Alfthan G, Huttunen JK, Pikkarainen J, Puska P. (1982) Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. Lancet.;2(8291):175-9.]

Santamaría A, Vázquez-Román B, La Cruz VP, González-Cortés C, Trejo-Solís MC, Galván-Arzate S, Jara-Prado A, Guevara-Fonseca J, Ali SF. (2005) Selenium reduces the proapoptotic signaling associated to NF-kappaB pathway and stimulates glutathione peroxidase activity during excitotoxic damage produced by quinolinate in rat corpus striatum. Synapse.;58(4):258-66.]

Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. (2007) Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. Heart Fail Rev. 12(3-4):261-6.]

Schulz R, Gres P, Skyschally A, Duschin A, Belosjorow S, Konietzka I, Heusch G. (2003) Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo. FASEB J; 17(10):1355-7.]

Schuster EH, Bulkley BH. (1979) Expansion of transmural myocardial infarction: a pathophysiologic factor in cardiac rupture. Circulation; 60(7):1532-8.]

Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. (2008) Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. Cardiovasc Res; 80(1):9-19. Epub 2008 Jun 2.]

- Simonoff M.** (1990) [Selenium: essentialness, content in food, supplementation, deficiency]. *J Pharm Belg. Mar-Apr;45(2):141-50.*]
- Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS.** (2001) Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.;280(1):C53-60.*]
- Smith JH, Green CR, Peters NS, Rothery S, Severs NJ.** (1991) Altered patterns of gap junction distribution in ischemic heart disease. An immunohistochemical study of human myocardium using laser scanning confocal microscopy. *Am J Pathol; 139(4):801-21.*]
- Somlyo AP, Somlyo AV.** (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature; 372(6503):231-6.* Review. Erratum in: *Nature 1994 Dec 22-29;372(6508):812.*]
- Spray DC, Harris AL, Bennett MV.** (1981) Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science; 211(4483):712-5.*]
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A.** (2003) Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α -induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation; 107(10):1418-23.*]
- Sun Y.** (2007) Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction. *Am J Med Sci; 334(3):197-205.*]
- Sundset R, Ytrehus K, Zhang Y, Saffitz JE, Yamada KA.** (2007) Repeated simulated ischemia and protection against gap junctional uncoupling. *Cell Commun Adhes.14(5):239-49.*]
- Swynghedauw B.** (2006) Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol;209(Pt 12):2320-7.*]
-
- Takahashi K, Newburger PE, Cohen HJ.** Glutathione peroxidase protein. Absence in selenium deficiency states and correlation with enzymatic activity. *J Clin Invest. 1986 Apr;77(4):1402-4.*]
- Tanguy S, Boucher F, Besse S, Ducros V, Favier A, de Leiris J.** (1998) Trace elements and cardioprotection: increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion-induced arrhythmias. *J Trace Elem Med Biol.12(1):28-38.*]
- Tanguy S, Boucher FR, Malfroy B, de Leiris JG.** (1996) Free radicals in reperfusion-induced arrhythmias: study with EUK 8, a novel nonprotein catalytic antioxidant. *Free Radic Biol Med.21 (7):945-54.*]

Tanguy S, Morel S, Berthonneche C, Toufektsian MC, de Lorgeril M, Ducros V, Tosaki A, de Leiris J, Boucher F. (2004) Preischemic selenium status as a major determinant of myocardial infarct size in vivo in rats. *Antioxid Redox Signal.* 6(4):792-6.]

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003 Dec;42(6):1075-81. Epub 2003 Oct 27.]

Tennant R, Wiggers CJ. (1935) The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am. J. Physiol.*; 112: 351-361.]

Tolando R, Jovanovic A, Brigelius-Flohé R, Ursini F, Maiorino M. Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation. *Free Radic Biol Med.* 2000 Mar 15;28(6):979-86.]

Toufektsian MC, Boucher F, Pucheu S, Tanguy S, Ribuot C, Sanou D, Tresallet N, de Leiris J. Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. *Toxicology.* 2000 Aug 7;148(2-3):125-32.]

Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G 3rd, Lefer AM. (1990) Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation*; 82(4):1402-12.]

Turoczi T, Chang VW, Engelman RM, Maulik N, Ho YS, Das DK. (2003) Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1.J *Mol Cell Cardiol.*;35(6):695-704.]

Vallee BL. (1952) The time course of serum copper concentrations of patients with myocardial infarctions. I. *Metabolism.* Sep;1(5):420-34.]

Van Breemen C, Saida K. (1989) Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annu Rev Physiol*; 51:315-29.]

Van Echteld CJ, Kirkels JH, Eijgelshoven MH, van der Meer P, Ruigrok TJ. (1991) Intracellular sodium during ischemia and calcium-free perfusion: a ^{23}Na NMR study. *J Mol Cell Cardiol*; 23(3):297-307.]

Venardos K, Harrison G, Headrick J, Perkins A. (2004) Selenium supplementation and ischemia-reperfusion injury in rats. *Redox Rep.*; 9(6):317-20.]

Venardos KM, Perkins A, Headrick J, Kaye DM. (2007) Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem.*;14(14):1539-49. Erratum in: *Curr Med Chem.* 2007;14(27):2944. Perkins A and Headrick J.]

Versieck J, Barbier F, Speecke A, Hoste J. (1975) Influence of myocardial infarction on serum manganese, copper, and zinc concentrations. *Clin Chem.* Apr;21(4):578-81.]

- Von Harsdorf R, Li PF, Dietz R.** (1999) Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation*. Jun 8;99(22):2934-41.]
- Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, Koster JF.** (1992) Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J Clin Invest*; 90(5):2050-5.]
- Vunta H, Davis F, Palempalli UD, Bhat D, Arner RJ, Thompson JT, Peterson DG, Reddy CC, Prabhu KS.** (2007) The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem*;282(25):17964-73.]
-
- Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, et al.** (1988) The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 22(7):447-55.]
- Warn-Cramer BJ, Lampe PD, Kurata WE, Kanemitsu MY, Loo LW, Eckhart W, Lau AF.** Characterization of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on the connexin-43 gap junction protein. *J Biol Chem*. 1996 Feb 16;271(7):3779-86.]
- Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B.** (1988) Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation*.;78(1):186-201.]
- White HD, Chew DP.** (2008) Acute myocardial infarction. *Lancet*; 372(9638):570-84.]
- White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ.** (1987) Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*; 76(1):44-51]
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, Deutsch U, Söhl G.** (2002 May) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*.;383(5):725-37.]
- Wollert KC, Studer R, von Bülow B, Drexler H.** (1994) Survival after myocardial infarction in the rat. Role of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation*;90(5):2457-67.]
- Wu ZK, Iivainen T, Pehkonen E, Laurikka J, Tarkka MR.** (2002) Ischemic preconditioning suppresses ventricular tachyarrhythmias after myocardial revascularization. *Circulation* 106(24):3091-6.]
- Xia Y, Zhao X, Zhu L, Whanger PD.** (1992) Distribution of selenium in erythrocytes, plasma and urine of Chinese men of different selenium status. *J Nutr Biochem*; 3: 211-216.]

Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsu S, Kashiwase K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Watanabe T, Asahi M, Taniike M, Matsumura Y, Tsujimoto I, Hongo K, Kusakari Y,

Kurihara S, Nishida K, Ichijo H, Hori M, Otsu K. (2003) Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 23;100(26):15883-8. Epub 2003 Dec 9.]

Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, Sun SZ. (1983) Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr.*;37(5):872-81.]

Yeh HI, Lupu F, Dupont E, Severs NJ. (1997) Upregulation of connexin43 gap junctions between smooth muscle cells after balloon catheter injury in the rat carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;17(11):3174-84.]

Zachara BA. Mammalian selenoproteins. (1992) *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. Sep;6(3):137-51.]

Zamanis A, Verdetti J, de Leiris J. (1982) Reduction of ischemia-induced myocardial necrosis in the rat with permanent coronary artery occlusion under the effect of diltiazem. *J Mol Cell Cardiol*. 14(1):53-62.]

Zima AV, Blatter LA. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.*;71(2):310-21. Epub 2006 Mar 6.]

Zou MH, Shi C, Cohen RA. (2002) Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest*;109(6):817-26.]

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. (1987) Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84(5):1404-7.]

Zweier JL, **Talukder** MA. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*; 70(2):181-90. Epub 2006 Mar 3.]

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

- Figure 1:** Séquence des altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique
- Figure 2 :** Différent types de post-dépolarisation participant aux FV.
- Figure 3 :** Mécanismes du remodelage ventriculaire cardiaque gauche post-infarctus.
- Figure 4 :** Mécanismes de couplage excitation-contraction dans le muscle lisse vasculaire.
- Figure 5 :** Mécanismes de relaxation du muscle lisse.
- Figure 6 :** NO et stress oxydant
- Figure 7 :** Analyse structurale d'une jonction communicante.
- Figure 8 :** Structure d'une jonction de type gap.
- Figure 9 :** Schéma des différentes sources endogènes et exogènes d'ERDO au niveau de l'organisme.
- Figure 10 :** Voies de production d'ERO et systèmes antioxydants (non exhaustive).
- Figure 11:** Principales cibles cellulaires des espèces réactives dérivées de l'oxygène.
- Figure 12:** Paramètres hémodynamiques caractérisant la contracture ischémique.
- Figure 13 :** Détermination des constantes de rigidité k à partir des courbes pression-volume.
- Figure 14 :** Représentation schématique de l'analyse de la géométrie cardiaque sur une coupe
- Figure 15 :** Effet du sélénium sur la sévérité des arythmies de la reperfusion.
- Figure 16 :** Évolution de la pression ventriculaire gauche en fonction du volume de solution physiologique perfusée dans la cavité ventriculaire gauche de façon passive *ex-vivo*.
- Figure 17 :** Évaluation du pourcentage de nécrose après 1 heure d'occlusion de l'artère coronaire gauche suivie de 8 jours de reperfusion.
- Figure 18 :** Dispositif de mesure de contractilité vasculaire.
- Figure 19:** Courbes effet-dose des anneaux d'aorte en réponse au phényléphrine.
- Figure 20 :** Courbes effet-dose des anneaux d'aorte en réponse à l'acétylcholine.
- Figure 21 :** Courbes effet-dose des anneaux d'aorte en réponse au sodium nitroprussiate.
- Figure 22 :** Protocole ELISA Sandwich.
- Figure 23 :** Effet du sélénium sur l'activité glutathion peroxydase cardiaque mesurée.
- Figure 24 :** Effet du sélénium sur l'activité catalase cardiaque mesurée 8 jours après la reperfusion post-infarctus chez le rat.
- Figure 25 :** Effet du sélénium sur la teneur cardiaque en TNF- α mesurée par la technique ELISA sandwich à 8 jours post-infarctus chez le rat
- Figure 26 :** Effet du sélénium sur le niveau de déphosphorylation de la connexine 43 cardiaque, dosé par WI à 8 jours post-infarctus chez le rat.

Figure 27 : Effet du sélénium sur le niveau de total cardiaque de la connexine 43 dosé par Western Blot à 8 jours post-infarctus chez le rat.

Figure 28 : Voies de signalisation intracellulaires à l'origine de la synthèse du TNF- α .

Figure 29 : Evolution pondérale des animaux au cours du post-infarctus.

Figure 30 : Evolution des courbes pression-volume mesurées *ex-vivo* 8 jours après reperfusion post-ischémique.

Figure 31 : Relation entre la taille de l'infarctus 8 jours après la reperfusion post-ischémique et le statut plasmatique en sélénium des animaux avant l'ischémie/reperfusion.

Figure 32 : Relation entre le sélénium plasmatique et les indices morphométriques cardiaques mesurés 8 jours après la reperfusion post-ischémique. : A-Indice de dilatation, B-Indice de rétrécissement et C-Indice d'expansion.

Figure 33 : Relation entre statut plasmatique en sélénium et les épaisseurs minimales des différents parois cardiaques mesurées 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Solutions utilisées pour le dosage des activités des enzymes anti-oxydantes.

Tableau 2 : Paramètres fonctionnels après 10 minutes de perfusion normoxique *ex-vivo* des groupes de cœurs de Rat.

Tableau 3 : Evolution des paramètres fonctionnels de cœurs isolés de Rat perfusés pendant 35 minutes en conditions normoxiques.

Tableau 4: Paramètres fonctionnels de cœurs isolés de Rat évalués à 20 minutes de perfusion normoxique.

Tableau 5 : Effet de la durée de l'ischémie sur les paramètres caractéristiques de la contracture ischémique.

Tableau 6 : Effet de la reperfusion après une courte période d'ischémie sur les paramètres fonctionnels (groupe B).

Tableau 7 : Effet de la durée d'ischémie globale et de la reperfusion sur les concentrations tissulaires en glutathion oxydé et réduit.

Tableau 8 : Effet de la durée d'ischémie globale et de la reperfusion sur la teneur tissulaire en Cx43 déphosphoylée de cœurs de rats perfusé *ex-vivo*.

Tableau 9 : Evolution des paramètres fonctionnels de cœurs isolés perfusés de Rat durant le protocole expérimental.

Tableau 10 : Incidence des arythmies de reperfusion.

Tableau 11 : Effet de la supplémentation en sélénium les concentrations tissulaires en glutathion oxydé et réduit.

Tableau 12 : Régimes alimentaires utilisés pour le traitement des animaux.

Tableau 13 : Poids et statut plasmatique en sélénium après 5 semaines de prétraitement chez le rat.

Tableau 14 : Statut plasmatique en sélénium des rats nourris au régime appauvris et enrichis en sélénium, avant et après l'induction d'un infarctus du myocarde.

Tableau 15 : Tableau de recensement de la mortalité des animaux au cours de l'expérimentation.

Tableau 16 A: Taux de mortalité globale des animaux après l'IDM.

Tableau 16 B: Taux de mortalité lié à l'ischémie.

Tableau 17 : Effet du sélénium sur les paramètres hémodynamiques en conditions basales: mesures sur le rat anesthésié 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Tableau 18 : Effet du sélénium sur les paramètres hémodynamiques en conditions de surcharge volumique : mesures sur le rat anesthésié 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Tableau 19: Effet du sélénium sur les paramètres hémodynamiques 10 min après une surcharge volumique : mesures sur le rat anesthésié 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Tableau 20: Effet du sélénium sur les constantes de rigidité du ventricule gauche et le volume résiduel télédiastolique intracavitaire gauche mesurés 8 jours après la reperfusion post-infarctus.

Tableau 21 : Effet du sélénium sur les indices morphométriques cardiaques mesurés 8 jours après la reperfusion post-infarctus.

Tableau 22 : Effet de l'infarctus du myocarde sur la réactivité vasculaire d'anneau d'aorte évaluée 8 jours après la reperfusion post-ischémique.

Tableau 23 : Fonction cardiaque mesurée à 8 jours de reperfusion post-ischémique.

Tableau 24 : Constantes de rigidité k, volume mort et volume mort résiduel télédiastolique déterminés à partir des courbes pression-volume.

Tableau 25 : Effet de l'infarctus du myocarde sur la teneur plasmatique totale en oligo-éléments essentiels mesurée au cours du post-infarctus chez le rat.

Tableau 26 : Activité cardiaque des enzymes antioxydantes mesurée 8 jours après la reperfusion du tissu ischémique.

RÉSUMÉ

Sélénium et cardiopathies ischémiques : effets d'une supplémentation nutritionnelle chez le rat

Dans le présent travail qui s'inscrit dans le cadre général de la protection du tissu cardiaque, nous avons mis en évidence les effets protecteurs d'un oligo-élément antioxydant, le sélénium, au cours du post-infarctus et tenté d'analyser les mécanismes cellulaires mis en jeu dans ces effets. Dans une première partie, sur un modèle d'ischémie/reperfusion *ex-vivo*, nous démontrons qu'une alimentation enrichie en sélénium (1,5 mg/kg, *p.o.*) limite significativement les arythmies ventriculaires malignes (AVM) dues à l'ischémie/reperfusion en améliorant le statut rédox cellulaire et en limitant la déphosphorylation de la connexine 43. Cette déphosphorylation, proportionnelle à l'intensité et à la sévérité du stress ischémique, entraîne des anomalies de l'excitabilité myocardique, responsables de l'apparition des AVM. Dans une deuxième partie, nous confirmons cet effet cardioprotecteur *in-vivo*. Dans ces conditions, le sélénium réduit significativement la mortalité due à l'ischémie myocardique et la taille de l'infarctus, et améliore le remodelage cardiaque précoce post-infarctus. Dans la troisième partie, nous montrons que ces effets protecteurs sont associés à une diminution significative du niveau cardiaque de TNF- α et à une amélioration de la capacité antioxydante tissulaire à 8 jours post-infarctus. Enfin, nos résultats montrent que le statut en sélénium est inversement corrélé à la taille de l'infarctus et peut être modulé par l'ischémie/reperfusion. Le statut préischémique en sélénium semble donc conditionner la sensibilité du myocarde à l'ischémie/reperfusion et déterminer le pronostic post-infarctus.

Mots clés : ischémie/reperfusion myocardique, infarctus du myocarde, remodelage cardiaque, TNF- α , connexine 43, stress oxydant, sélénium, nutrition.

ABSTRACT

Selenium and myocardial infarction: effects of nutritional supplementation in Rat

The present report registered within the general framework of the protection of cardiac tissue. We highlighted the protective effects of an antioxidant trace element, selenium, during the post-infarction and tried to analyze the cellular mechanisms concerned in this effect. In the first part, using an *ex-vivo* model of ischemia/reperfusion, we showed that an enriched selenium (1,5 mg/kg, *p.o.*) diet limits significantly the malignant ventricular arrhythmias (AVM) due to ischemia/reperfusion by improving the cellular redox status and by limiting the dephosphorylation of the connexin 43. This dephosphorylation, proportional to the intensity and the severity of the ischemic stress, leads to abnormalities in myocardial excitability, involved in the appearance of the AVM. In a second part, we confirmed this cardioprotective effect *in-vivo*. Under these conditions, selenium significantly reduced both the mortality due to myocardial ischemia and the infarct size, and improved cardiac remodeling in early post-infarction. In the third part, we showed that these protective effects are associated with a significant reduction of the cardiac level of TNF- α and with an improvement of the tissue antioxidant capacity measured at 8 day-post-infarction. Lastly, our results showed that the selenium status is conversely correlated with the infarct size and can be modulated by ischemia/reperfusion. Thus, the preischemic selenium status seems to condition the sensitivity of the myocardium to ischemia/reperfusion and to determine the post-infarction prognosis.

Key-words: ischemia/reperfusion, myocardial infarction, remodeling, TNF- α , connexin 43, oxidative stress, selenium, nutrition.