



HAL
open science

Cardioprotection à la phase aiguë de l'infarctus

Nehmat Ghaboura

► **To cite this version:**

Nehmat Ghaboura. Cardioprotection à la phase aiguë de l'infarctus. Médicaments. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00586689

HAL Id: tel-00586689

<https://theses.hal.science/tel-00586689>

Submitted on 18 Apr 2011

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.

CARDIOPROTECTION À LA PHASE AIGUË DE L'INFARCTUS**THÈSE DE DOCTORAT**

Spécialité : Pharmacologie expérimentale et clinique

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

Présentée et soutenue publiquement

Le 23 Septembre à 14 heures 30

par **Nehmat GHABOURA**

Devant le jury ci-dessous :

Docteur Bijan GHALEH-MARZBAN	Rapporteur externe	INSERM U955
Docteur Stéphane GERMAIN	Rapporteur externe	INSERM U833
Docteur Maria Carmen MARTINEZ	Examineur	CNRS 6214- INSERM U771
Professeur Alain FURBER	Examineur	UPRES EA 3860

Directeur de thèse : **Professeur Fabrice PRUNIER****Laboratoire de Protection et Remodelage du Myocarde
UPRES EA 3860
Faculté de Médecine****ED (N°) 502**

To my lovely Ziad,

To my parents,

To my brother Yehya and my sister Sarah,

To my best friends ever Omar and Hamoud,

To my friends.

Professor Fabrice PRUNIER, I couldn't wish a supervisor better than you. With your great efforts to explain things clearly and simply, your enthusiasm and lots of the interesting ideas that you provided to me, you helped to make research life enjoyable for me. It's a pleasure to convey my sincere gratitude to you for challenging me every day to make me a better scientist. This manuscript would be unintelligible to read at all without your help.

Doctor Bijan GHALEH-MARZBAN, Doctor Stéphane GERMAIN, Doctor Maria Carmen MARTINEZ and Professor Alain FURBER, it's an honor for me to thank you, as members of my reading committee, for taking the time to assess my manuscript.

My sincere thanks also go to my labmates (past and present): Sophie TAMAREILLE, Julien JEANNETEAU, Victor MATHEUS, Frédéric TREGUER, Anthony MERCIER and Dalia KHACHMAN.

I also owe my gratitude to Doctor Annie ROCHETAING for enlightening me the first glance of research.

I am much indebted to Julien for using his precious times to read this manuscript. I have also benefited by advice from Sophie who always grants me her time even for answering some of my unintelligent questions.

It's a pleasure to pay tribute to the collaborators. Many thanks go to Doctor Daniel HENRION, Doctor Pierre-Henri DUCLUZEAU, Doctor Anne CROUÉ and Doctor Yves TOURMEN.

And last but not least, I would like to thank Mr Pierre LEGRAS and Mr Jérôme ROUX for their sympathetic help.

Sommaire

Introduction générale	5
Chapitre I. Données bibliographiques	9
I. Les lésions de reperfusion	9
1.1. Les potentiels médiateurs impliqués dans les lésions de reperfusion	11
1.1.1. Le paradoxe de l'oxygène	11
1.1.2. Le paradoxe du calcium	13
1.1.3. Le paradoxe du pH	14
1.1.4. Le paradoxe de la restauration rapide de l'osmolalité	15
1.1.5. L'implication du pore de transition de perméabilité mitochondrial dans les lésions de reperfusion	16
1.2. Les stratégies de prévention des lésions de reperfusion	17
1.2.1. Les activateurs de la voie RISK	17
1.2.2. Les activateurs de la voie SAFE	20
1.2.2.1. <i>Cross-talk</i> entre la voie RISK et la voie SAFE	23
1.2.3. Les inhibiteurs du mPTP	25
1.2.3.1. Rôle de la glycogène synthase kinase (GSK-3 β)	26
II. La cardioprotection mécanique	27
2.1. Concept du préconditionnement	27
2.2. Le postconditionnement ischémique	29
2.2.1. Définition	29
2.2.2. Effet cardioprotecteur du postconditionnement	30
2.2.3. Mécanisme d'action	31
2.2.4. Implication clinique	35
2.3. Le conditionnement à distance	36
2.3.1. Description	37
2.3.1.1. Le préconditionnement à distance	37
2.3.1.2. Le perconditionnement à distance	37
2.3.1.3. Le postconditionnement à distance	38
2.3.2. Mécanisme d'action	39
3.2.2.1. Implication des facteurs humoraux	40
3.2.2.2. Implication neuronale	40
3.2.2.3. Effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique	41
3.2.2.4. Le mécanisme au sein du myocarde	42
2.3.3. Application clinique	43
III. La cardioprotection pharmacologique	46

3.1. L'érythropoïétine	46
3.1.1. Description	46
3.1.2. Les récepteurs à l'érythropoïétine	47
3.1.3. Effet cardioprotecteur de l'érythropoïétine	48
3.1.4. Mécanisme de la cardioprotection induite par l'érythropoïétine	49
3.1.4.1. Inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes	49
3.1.4.2. Inhibition de l'inflammation	49
3.1.4.3. Les voies de signalisation impliquées dans le mécanisme de l'érythropoïétine	50
3.1.4.4.1. La voie RISK	50
3.1.4.4.2. La voie JAK/STAT	51
3.1.4.4.3. Autres voies	52
3.1.5. Implication clinique	52
IV. Lésions de reperfusion et dysrégulation du glucose	53
4.1. Infarctus du myocarde et diabète	53
4.1.1. Modèles des rats diabétiques type 1	54
4.1.2. Diabète type 1 et stratégies cardioprotectrices	55
4.2. Infarctus du myocarde et insulino-résistance	56
Chapitre II. Travaux et Résultats	58
Projet 1. Étude des lésions de reperfusion myocardique : L'érythropoïétine comparée au postconditionnement ischémique	58
1. Introduction	58
2. Matériels et méthodes	59
3. Résultats	68
4. Discussion	69
Projet 2 : Étude de rôle du diabète sur l'effet cardioprotecteur de l'érythropoïétine	71
1. Introduction	71
2. Matériels et méthodes	72
3. Résultats	76
4. Discussion	77
Projet 3 : Implication de la voie RISK/GSK-3β dans le mécanisme d'action du postconditionnement à distance : comparaison avec le postconditionnement classique	80
1. Introduction	80
2. Matériels et méthodes	80

3. Résultats	83
4. Discussion	84
Chapitre III. Discussion et Perspectives	88
Références bibliographiques	98
ANNEXES	135
Liste des principales abréviations	136
Liste des illustrations	137

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Dans la majorité des cas l'infarctus de myocarde (IDM) est du à une occlusion complète et brutale d'une artère coronaire par un thrombus. La thrombose survient en général sur une plaque d'athérome préexistante; elle est d'abord constituée par un amas de plaquettes avant de devenir fibrino-cruorique et aboutit à l'occlusion coronaire complète. La rupture de la plaque athéromateuse (ulcération ou fissuration) est à l'origine de la thrombose.

Les autres mécanismes à l'origine d'un IDM sont plus rares : spasme sur les coronaires saines ou peu lésées (IDM juvéniles secondaires au stress, efforts violents), embolie coronaire, dissection coronaire.

En l'absence de circulation collatérale, une occlusion coronaire entraîne une nécrose du territoire myocardique correspondant. La nécrose débute par la région sous-endocardique. Au bout de 3 à 6 heures, la nécrose s'étend vers le territoire sous-épicaudique. Au-delà de la 6^{ième} heure, la nécrose est fréquemment transmurale. Les conséquences de l'occlusion coronaire sont bien identifiées : si l'occlusion se prolonge, l'ischémie aiguë conduit à la nécrose qui progresse des couches sous-épicaudiques du centre de la zone normalement irriguée par l'artère occluse vers sa périphérie et l'épicarde. C'est ce qu'on appelle le "*wavefront phenomemen of ischemic cell death*" développé par Reimer et Jennings (Reimer et Jennings. 1979). La mort des cellules myocardiques est à l'origine de la libération de CPK, myoglobine, troponine... dont le dosage permet le diagnostic biologique d'IDM. La nécrose du myocarde entraîne une perte de la fonction contractile (akinésie) irréversible.

L'infarctus du myocarde est une maladie avec un risque fatal important à court et à moyen terme mais sa morbi-mortalité a toutefois été réduite de façon significative depuis 20 ans grâce à des progrès réalisés à plusieurs niveaux notamment dans la vitesse de prise en charge des patients et dans les traitements instaurés. La stratégie thérapeutique actuelle a pour objectif de reperfusion rapidement l'artère responsable de l'IDM, par thrombolyse intraveineuse ou par

angioplastie coronaire primaire (*Percutaneous Coronary Intervention, PCI*). En effet, une reperfusion précoce diminue la mortalité et les risques des complications comme l'insuffisance cardiaque. Le bénéfice de la reperfusion est étroitement dépendant de son délai de mise en route : plus la revascularisation est rétablie rapidement, plus la réduction de mortalité et la récupération fonctionnelle seront importantes. Pendant les premières minutes d'ischémie, les dommages cellulaires sont réversibles. Dans un modèle d'IDM chez le chien in vivo le myocarde reperfusé 15 minutes après occlusion coronaire ne présentait pas d'infarctus (Jennings et Reimer. 1983). Dans ce même modèle une reperfusion réalisée 3 heures après l'ischémie n'a entraîné qu'une faible réduction de la taille d'infarctus. La durée de l'occlusion constitue donc l'élément majeur pour une reperfusion coronaire. Il existe une période de temps critique pour le sauvetage du myocarde ischémique. Chez l'homme cette période n'est pas bien définie, mais la plupart des études cliniques suggèrent que la nécrose est complète à la 6^{ième} heure d'apparition des douleurs thoraciques (d'où la notion des "6 golden hours" du traitement de l'IDM) (Braunwald. 1989) en l'absence de circulation collatérale.

S'il est clair qu'une reperfusion précoce et complète est le seul moyen pour limiter l'étendue de l'infarctus, la reperfusion elle même peut provoquer des lésions nommées lésions de reperfusion. Elles ont été décrites pour la première fois par Jennings et al. (Jennings et al. 1960). Ces lésions de reperfusion correspondent à un phénomène qui se produit au moment de la reperfusion et qui peut être atténué en intervenant par un moyen protecteur au moment de la reperfusion. Plusieurs débats ont eu lieu sur la contribution des lésions de reperfusion dans la taille finale de l'infarctus, qui auparavant était considérée comme étant la conséquence de l'ischémie myocardique seulement. Les données sur le postconditionnement ischémique (défini plus loin) ont réactivé le débat sur la nécrose de reperfusion. Le fait que l'on puisse réduire de moitié la taille de l'infarctus par une intervention qui se situe au moment de la reperfusion implique incontestablement qu'au moins la moitié de la taille de l'infarctus soit en rapport avec des phénomènes se produisant lors de la reperfusion (Figure 1).

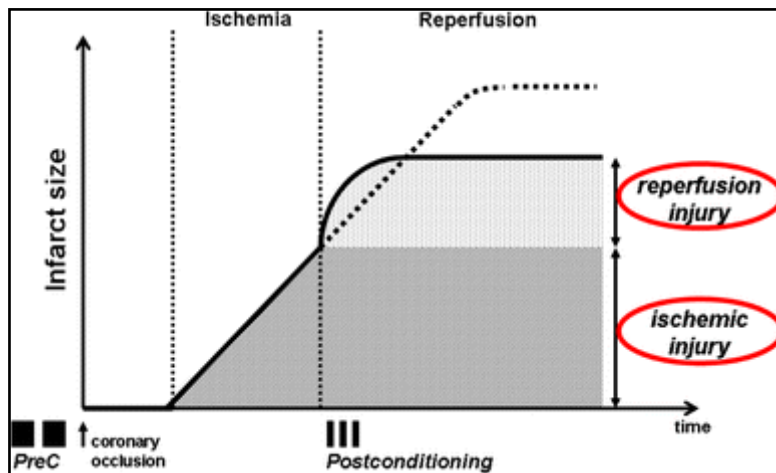


Figure 1 : La taille finale de l'infarctus est la conséquence des lésions myocardiques survenues pendant l'ischémie et lors de la reperfusion (Thibault et al. 2007).

De nombreuses études expérimentales et cliniques ont été réalisées dans le but de chercher un moyen cardioprotecteur efficace pour prévenir la survenue des lésions de reperfusion. La complexité de la physiopathologie de ces lésions rend difficile l'identification d'un moyen ayant un effet optimal. L'un des objectifs de notre groupe est d'identifier des interventions thérapeutiques efficaces contre les lésions de reperfusion pouvant être appliquées chez l'homme.

**DONNÉES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Chapitre I. Données bibliographiques

I. Les lésions de reperfusion

Lors de la survenue d'un IDM le moyen thérapeutique le plus efficace pour limiter la taille du myocarde infarci est la reperfusion. Cette reperfusion peut être obtenue en utilisant des agents thrombolytiques ou une angioplastie (PCI). Mais la restauration du flux sanguin au niveau de la zone ischémique provoque des lésions de reperfusion qui atténuent le bénéfice de la revascularisation.

Des lésions attribuées à la reperfusion ont été décrites pour la première fois par Jennings et al. en 1960. L'étude histologique réalisée sur des cœurs de chiens après ischémie-reperfusion a montré la présence d'un œdème des cardiomyocytes associé à des contractures des myofibrilles, une perturbation des sarcolemmes et la présence de particules de phosphates de calcium dans les mitochondries (Jennings et al. 1960).

Plusieurs dysfonctionnements cardiaques ont été identifiés après la reperfusion :

- a. La sidération myocardique "*myocardial stunning*" (Braunwald et Kloner. 1982) : Ce sont des perturbations mécaniques survenant après la reperfusion malgré l'absence des lésions irréversibles et malgré une restauration normale ou quasi-normale du flux coronaire. Ce type de perturbation est réversible ; la durée de l'ischémie n'étant pas suffisamment prolongée pour induire la nécrose des cardiomyocytes. Le myocarde se rétablit en quelques jours après la reperfusion. Plusieurs causes sont à l'origine de ce délai de récupération. Pendant l'ischémie, la concentration myocardique en ATP diminue rapidement ce qui engendre une accumulation intracellulaire des métabolites d'ATP : adénosine, hypoxanthine et inosine. Ces métabolites sont aussi les précurseurs de la synthèse d'ATP. Étant donné que la membrane cellulaire est perméable à ces métabolites, ils sont éliminés de la zone reperfusée par un phénomène du "*wash-out*". L'ATP est alors resynthétisée par d'autres voies de survie "*salvage pathways*". La récupération des fonctions

myocardiques dépend de la récupération du taux d'ATP, ce qui expliquerait l'existence de ce délai de récupération contractile.

- b. Le phénomène de "*no-reflow*" : il est défini par l'absence de reperfusion myocardique malgré la disparition de l'occlusion du vaisseau coronaire épicaordique (Krug et al. 1966). Ce phénomène a été décrit pour la première fois en 1974 par Kloner et al. (Kloner et al. 1974). Ils avaient observé dans la zone isohémique une désorganisation de la structure des capillaires en raison de la présence d'œdème endothélial et myocardique et une infiltration de neutrophiles (Kloner et al. 1980). Ce processus pathologique est accentué par la reperfusion, ce qui provoque une diminution progressive du débit coronaire (Komamura et al. 1994). L'œdème tissulaire, le dysfonctionnement endothélial, l'accumulation des neutrophiles au niveau des capillaires, l'inflammation et la synthèse des radicaux libres sont tous favorisés par la reperfusion (Manciet et al. 1994). Les microthromboembolies favorisent également l'obstruction des petites artères et des artéioles (Ito. 2006).
- c. Les lésions léthales de reperfusion : Elles sont définies comme étant des lésions myocardiques dues à la restauration du flux coronaire après un épisode d'ischémie prolongée. Elles sont responsables de la mort des cardiomyocytes qui étaient soumis à des lésions réversibles pendant l'ischémie (Piper et al. 1998). L'analyse du myocarde reperfusé ne permet pas de distinguer les lésions qui sont dues à l'ischémie de celles qui sont dues à la reperfusion. La capacité à réduire la mort cellulaire et la taille d'infarctus en changeant certaines conditions de reperfusion est le seul critère qui permet de valider l'existence des lésions de reperfusion (Piper et al. 1998).

Prévenir ces lésions léthales de reperfusion permettrait de réduire l'importance des dégâts myocardiques et contribuerait ainsi à réduire la morbi-mortalité post-infarctus.

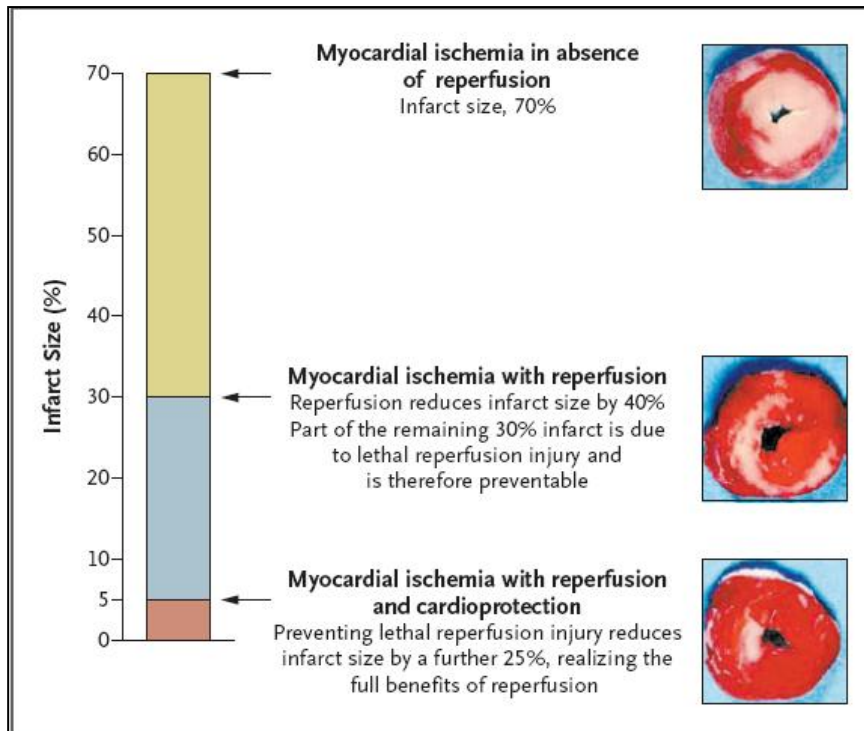


Figure 2 : Contribution des lésions léthales de reperfusion dans la taille finale de l'infarctus du myocarde. Le myocarde infarcté est coloré en blanc et le myocarde viable au niveau de la zone à risque en rouge orange. La taille de l'infarctus est exprimée en pourcentage de la zone à risque (Yellon et Hausenloy. 2007).

1.1. Les potentiels médiateurs impliqués dans les lésions de reperfusion

La physiopathologie des lésions de reperfusion n'est pas complètement connue. Plusieurs réponses paradoxales semblent concourir à leur survenue (Yellon et Hausenloy. 2007) :

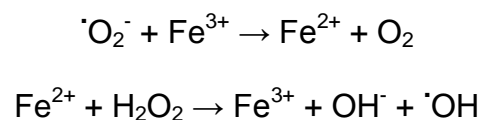
1.1.1. Le paradoxe de l'oxygène

La réoxygénation précoce du myocarde ischémique est indispensable pour éviter la nécrose des cardiomyocytes. Cependant, cette réoxygénation brutale peut avoir des effets néfastes. Une étude expérimentale a démontré la présence de lésions myocardiques sévères caractérisées par des hypercontractures des myofibrilles et une perturbation au niveau du sarcolemme dans le tissu réoxygéné après une période de déplétion en oxygène (Hearse et al. 1973). Ce paradoxe de l'oxygène est la conséquence de plusieurs processus :

- le déclenchement d'une contraction des myofibrilles ;
- l'activation de plusieurs pompes pour restaurer la balance cationique cellulaire ;
- la génération du stress oxydatif.

Pendant l'ischémie, la concentration en ions Na^+ et Ca^{2+} augmente dans le cytosol des cardiomyocytes. Le Ca^{2+} intracellulaire est responsable de l'activation des myofibrilles en présence d'oxygène. Cela va conduire à une génération excessive et non contrôlée de force : l'hypercontracture (Piper et al. 1998). D'autre part, la réoxygénation permet le rétablissement d'énergie et donc une réactivation rapide des pompes cationiques dont la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique (RE) et la pompe Na^+/K^+ -ATPase du sarcolemme. L'activation de la pompe Ca^{2+} -ATPase entraîne une accumulation calcique dans le RE. Si la capacité d'accumulation du RE est faible vis-à-vis de l'excès du Ca^{2+} cytosolique, un cycle calcique continue s'établit entre le cytosol et le RE. Cela va provoquer une oscillation du taux du Ca^{2+} cytosolique. L'excès de Ca^{2+} cytosolique active l'échangeur Na^+/Ca^+ membranaire entraînant un excès de Na^+ dans le cytosol à l'origine d'œdème cellulaire en l'absence de mécanismes compensateurs efficaces.

Après la reperfusion, une quantité importante du superoxyde d'oxygène est libérée. Ce superoxyde peut subir la réaction catalytique de Fenton et Haber-Weiss pour générer les radicaux hydroxyles (Zweier. 1988) :



Les radicaux hydroxyles entrent à leur tour en réaction avec plusieurs molécules biologiques pour former les radicaux R^\cdot , RO^\cdot et ROO^\cdot (Zweier. 1988).

L'implication des radicaux libres dans les lésions de reperfusion a été mise en évidence par plusieurs études expérimentales qui ont montré l'effet cardioprotecteur d'enzymes capables de capter les radicaux superoxydes "*superoxide radical-scavenging enzyme*" (Jolly et al. 1984 ; Werns et al. 1985 ; Chambers et al. 1985). Une diminution de la taille d'infarctus et une amélioration des fonctions contractiles après reperfusion a ainsi été mise en évidence dans un modèle d'IDM in vivo chez le chien en utilisant la superoxyde dismutase (SOD) bovine (Jolly et al. 1984 ; Werns et

al. 1985 ; Chambers et al. 1985). L'effet cardioprotecteur des SOD n'a pas été retrouvé dans d'autres études expérimentales (Gallagher et al. 1986 ; Uraizee et al. 1987). Cependant, une étude a récemment décrit un effet bénéfique de formes encapsulées des SOD (Seshadri et al. 2010).

1.1.2. Le paradoxe du calcium

La reperfusion d'un myocarde ischémique entraîne l'augmentation du taux calcique intracellulaire. Dans les cellules qui peuvent rétablir un contrôle cationique normal, le processus de rétablissement du taux calcique se divise en 2 phases : i) dans la première phase, le Ca^{2+} passe dans le RE et donc le taux du Ca^{2+} cytosolique diminue ; ii) dans la deuxième phase, il s'établit une oscillation du Ca^{2+} entre le RE et le cytosol. L'oscillation du Ca^{2+} observée dans la deuxième phase est responsable de l'hypercontracture (Siegmond et al. 1992). Le pic calcique cytosolique peut être à l'origine de ces hypercontractures (Ladilov et al. 1997). Cependant, le pic du calcium responsable de l'hypercontracture dans des cellules soumises à une hypoxie-réoxygénation ne provoque aucune lésion dans des cellules normales. Une augmentation de la sensibilité cellulaire au calcium semble contribuer à la génération des hypercontractures. L'augmentation de la sensibilité semble être liée à une augmentation de la fragilité des différentes composantes du cytosquelette (Piper et al. 1998). Il est possible expérimentalement de réduire l'hypercontracture provoquée par cette oscillation calcique en amortissant le cycle du Ca^{2+} entre le cytosol et le RE et donc en diminuant le pic du Ca^{2+} cytosolique (Ladilov et al. 1997). Il s'agit d'utiliser des agents qui inhibent le passage du Ca^{2+} vers le RE ou d'autres qui inhibent la libération du Ca^{2+} dans le cytosol (Gao et al. 1996). L'effet cardioprotecteur des inhibiteurs de la pompe Ca^{2+} -ATPase du RE a été démontré dans différents modèles expérimentaux. Avellanal et al. ont démontré dans un modèle de cœur de lapin isolé perfusé que l'utilisation de l'acide cyclopiazonique, un inhibiteur spécifique de la pompe Ca^{2+} -ATPase du RE, avant l'induction de l'ischémie entraînait une cardioprotection. Ils avaient suggéré que l'inhibition de la pompe Ca^{2+} -ATPase diminuait la contribution du RE dans le phénomène d'oscillation calcique (Avellanal et al. 1998). Plus récemment, l'influence de l'oscillation calcique sur la perméabilité de la membrane mitochondriale a également été rapportée (Ruiz-Meana et al. 2009). Dans cette étude réalisée sur des cardiomyocytes des rats, les auteurs

ont démontré la présence d'une hypercontracture et d'une altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale suite à une ischémie-reperfusion. L'utilisation de la thapsigargin, un agent qui inhibe le passage du Ca^{2+} dans le RE, et de la ryanodine, un inhibiteur de sa libération, avait significativement inhibée l'hypercontracture et l'altération de la membrane mitochondriale (Ruiz-Meana et al. 2009). À l'inverse, la surexpression de la pompe Ca^{2+} -ATPase a été associée à une amélioration de la fonction contractile et une diminution des arythmies ventriculaires chez le rat (del Monte et al. 2004) et le porc (Prunier et al. 2008) soumis à une ischémie-reperfusion.

1.1.3. Le paradoxe du pH

Le pH cytosolique des cardiomyocytes reperfusés joue un rôle important dans le développement de l'hypercontracture. Après une ischémie prolongée, le pH cytosolique est considérablement diminué par une production excessive du H^+ , suite à un métabolisme anaérobie et une déplétion en ATP. Cela conduit à une acidification intracellulaire et interstitielle. Après la reperfusion, le pH interstitiel se normalise rapidement. Un gradient s'établit alors entre le milieu intracellulaire où le taux de H^+ est toujours élevé et le milieu interstitiel où le taux de H^+ est déjà normalisé. Cela entraîne une activation des échangeurs Na^+/H^+ et des co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ au niveau des cardiomyocytes. Deux conséquences s'observent :

- l'acidose intracellulaire qui entraîne une inhibition de la contraction des myofibrilles va se réduire rapidement (Ladilov et al. 1995) ;
- Na^+/H^+ va s'activer et provoquer un influx cytosolique du Na^+ . Cela va entraîner une activation d'autres pompes pour rétablir le taux du Na^+ intracellulaire tel que l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ce qui en résulte alors une augmentation du taux du Ca^{2+} intracellulaire. L'élimination rapide du H^+ et l'apport calcique qui en résulte favorisent le développement des hypercontractures (Piper et al. 1998).

Il a été démontré dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé que le maintien de l'acidose extracellulaire, et par conséquent l'acidose intracellulaire, durant la phase précoce de réoxygénation protégeait les cardiomyocytes contre le

développement des hypercontractures (Bugge et al. 1995). Dans une autre étude réalisée sur des cardiomyocytes de rats nouveau-nés, l'utilisation d'un tampon pH acide au moment de la réoxygénation a entraîné une cardioprotection (Bond et al. 1991). Par contre, dans un modèle d'IDM in vivo chez le porc, l'utilisation du HOE642 (un inhibiteur spécifique de l'échangeur Na^+/H^+) au moment de la reperfusion n'a eu aucun impact sur la taille finale de l'infarctus (Garcia-Dorado et al. 1997). Cela peut être expliqué par le fait que la cellule possède une autre voie de régulation du taux de H^+ , le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$.

1.1.4. Le paradoxe de la restauration rapide de l'osmolalité

Comme nous l'avons déjà précisé, le taux de Na^+ cytosolique augmente après la reperfusion. Ce flux sodique qui s'accompagne d'un flux d'eau, semble être le facteur le plus important dans le changement de l'osmolalité cellulaire. D'autre part, les métabolites résultant d'une réaction anaérobie s'accumulent dans les deux compartiments, intracellulaire et interstitiel au niveau du myocarde soumis à une ischémie. Cette accumulation des métabolites provoque une augmentation de la charge osmotique dans ces deux compartiments (Grinstein et al. 1992). Après la reperfusion, les métabolites du milieu interstitiel se déplacent par un phénomène de "*wash-out*" et un gradient osmotique s'établit entre le milieu intra et extracellulaire (Garcia-Dorado et al. 1993). Alors le flux d'eau vers la cellule augmente ce qui provoque une augmentation de la pression intracellulaire ainsi qu'un étirement du sarcolemme. Ce sarcolemme est déjà fragilisé par la déplétion énergétique qui se déroule pendant l'ischémie. L'étirement du sarcolemme fragilisé s'ajoute à l'hypercontracture et entraîne la destruction de la cellule (Schlüter et al. 1996). L'œdème cellulaire et l'étirement qui en résulte ne provoque aucune lésion dans des cardiomyocytes normaux, non soumis à une ischémie-reperfusion. Dans un modèle de cardiomyocytes de rat isolés, le stress osmotique a provoqué une altération du sarcolemme seulement dans les cellules qui développaient des hypercontractures suite à une déplétion énergétique prolongée (Ruiz-Meana et al. 1995). Dans cette étude la réoxygénation avec un inhibiteur de la contractilité (le 2,3-butanedione monoxime) inhibait l'hypercontracture après réoxygénation et préservait la viabilité des cardiomyocytes. L'hypercontracture donc joue un rôle important dans la perturbation sarcolemmale induite par le stress osmotique. Des études utilisant une

reperfusion hyperosmotique ont démontré que l'atténuation du stress osmotique peut limiter la nécrose myocardique durant la reperfusion. Dans les modèles d'IDM in vivo chez le chien (Kloner et al. 1976) et le porc (Garcia-Dorado et al. 1992), l'injection d'une solution du mannitol hypertonique à la reperfusion a permis une réduction significative de la taille d'infarctus.

1.1.5. L'implication du pore de transition de perméabilité mitochondrial dans les lésions de reperfusion

Le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) ou le mégacanal mitochondrial, est un acteur important de plusieurs processus physiologiques. C'est un canal mitochondrial transitoire ayant une perméabilité très importante et des états de conductances multiples. L'ouverture prolongée de ce pore entraîne un gonflement mitochondrial, un effondrement du potentiel de membrane, une libération du calcium et un découplage de la phosphorylation oxydative ce qui engendre une déplétion en ATP et la mort cellulaire (Hausenloy et Yellon. 2003).

Le mPTP semble être associé aux sites de contact entre la membrane interne et externe. La structure moléculaire du pore n'est pas encore établie avec certitude, mais semble comprendre la porine de la membrane externe (ou la VDAC "*voltage-dependent anion channel*"), l'ATP/ADP translocase de la membrane interne (ou et l'ANT "*adenine nucleotide translocator*") et la cyclophiline D (CyP-D), cible de la cyclosporine dans la matrice. D'autres transporteurs pourraient être impliqués et des kinases associées à la mitochondrie (hexokinase, créatine kinase, glycérol kinase) peuvent aussi en faire partie (Ventura-Clapier et Lombès. 2007).

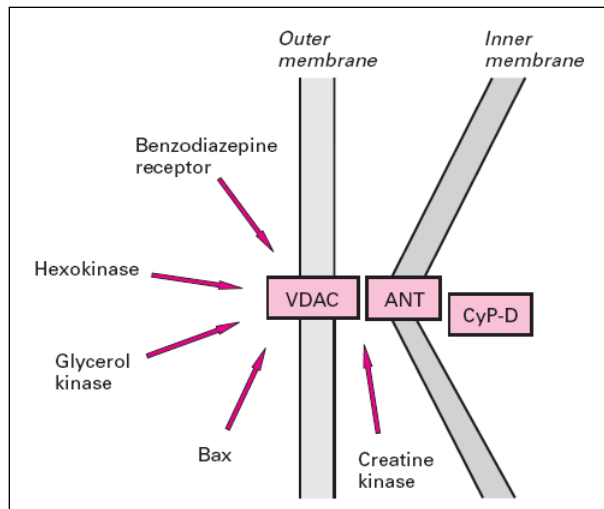


Figure 3 : L'unité basique du pore de transition semble être formée du complexe VDAC/ANT/CyP-D ainsi que d'autres protéines qui peuvent être couplées à ce complexe (Crompton. 1999).

Durant l'ischémie myocardique le mPTP reste fermé et s'ouvre pendant les premières minutes de la reperfusion, suite à l'augmentation du flux calcique et du stress oxydatif, suite à la restauration du pH physiologique et à la déplétion en ATP (Griffiths et Halestrap. 1995). Le mPTP est un acteur critique des lésions de reperfusion et représente une cible thérapeutique importante pour optimiser la cardioprotection. Les données sur l'effet cardioprotecteur des inhibiteurs de l'ouverture de ce pore seront détaillées plus loin.

1.2. Les stratégies de prévention des lésions de reperfusion

L'activation de plusieurs voies de signalisation a été décrite dans la cardioprotection contre les lésions de reperfusion. Nous allons détailler les deux principales voies : la voie RISK et la voie SAFE.

1.2.1. Les activateurs de la voie RISK

L'activation de la voie RISK "*Reperfusion Injury Salvage Kinase*" au moment de la reperfusion myocardique induit une cardioprotection en limitant les lésions de reperfusion (Hausenloy et Yellon. 2004 ; Yellon et Baxter. 1999). Plusieurs données précliniques indiquent que l'activation de la voie RISK par des agents

pharmacologiques (Hausenloy et Yellon. 2004 ; Hausenloy et Yellon. 2007) ou par des interventions mécaniques tels que le préconditionnement ou le postconditionnement (Hausenloy et al. 2005) peut entraîner une réduction de plus de 50% de la taille d'infarctus.

La voie RISK est constituée de la voie phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K) et de la voie p42/44 "*extracellular signal-regulated kinase*" (ERK1/2). Au niveau cardiaque, le rôle protecteur de la PI3K contre les effets délétères des lésions de reperfusion passe par l'activation de la sérine thréonine kinase Akt (ou protéine kinase B) (Matsui et al. 2001). ERK1/2 ou p42/44, membres de la famille des MAPK "*Mitogen activated protein kinases*", sont des sérine-thréonine kinases impliquées dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Parmi les cinq isoformes d'ERK identifiées, ERK1 et ERK2 sont les deux formes les plus abondamment exprimées au niveau cardiaque (Lips et al. 2004). ERK1/2 sont les effecteurs des MEK1/2 qui sont elles-mêmes des effecteurs de Raf. La voie de signalisation Raf/MEK1/2/ERK1/2 est activée par une protéine couplée à la guanine nucléotide (Ras), qui est responsable de plusieurs fonctions telles que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Ces fonctions dépendent de la nature des stimuli et du type cellulaire (Rafiee et al. 2005).

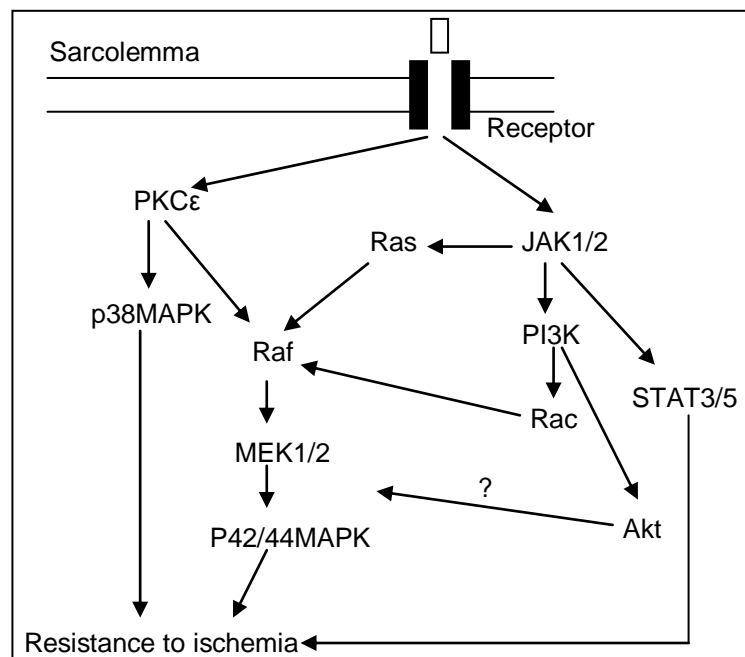


Figure 4 : Schéma représentatif de différentes voies de signalisation (Reproduced from Rafiee et al. 2005).

La limitation de la taille d'infarctus suite à l'activation de la voie RISK passe par un mécanisme anti-apoptotique via l'inhibition des protéines pro-apoptotiques telles que BAX et BAD, l'inhibition de l'activité de la caspase 3, l'activation de la p70s6K (qui elle inhibe BAD) et l'activation de la protéine Bcl-2 "*B-cell lymphoma*" anti-apoptotique (Yellon et Baxter. 1999). À côté de cet effet anti-apoptotique observé suite à l'activation de la voie RISK, un effet anti-nécrotique semble avoir un rôle dans la cardioprotection. Cet effet anti-nécrotique est dû en partie à l'inhibition de l'ouverture du mPTP suite à l'activation de RISK. Le mécanisme par lequel la voie RISK inhibe l'ouverture du mPTP n'est pas bien établi ; plusieurs hypothèses ont été établies :

- a) l'implication de la GSK-3 β dans l'inhibition de l'ouverture du mPTP (détaillé plus loin) (Davidson et al. 2006);
- b) eNOS, un effecteur de la voie RISK pouvant inhiber l'ouverture du mPTP par l'activation de la voie PKG/PKC ϵ /canaux mK⁺_{ATP} (Costa et al. 2005 ; Jaburek et al. 2006) ou par la génération de l'oxyde nitrique (Kim et al. 2004) ;
- c) l'inhibition de la translocation du BAX dans la mitochondrie (Yamaguchi et Wang. 2001) et/ou l'activation de l'hexokinase II mitochondriale peuvent contribuer à l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Pastorino et al. 2005) ;
- d) l'amélioration du flux calcique au niveau du réticulum sarcoplasmique peut entraîner une inhibition de l'ouverture du mPTP (Abdallah et al. 2006).

La cardioprotection induite par l'activation de la voie RISK peut être due aussi à la limitation de l'autophagie. Valentim et al. ont démontré que l'activation de Akt suite à l'utilisation de l'urocortine pouvait atténuer l'autophagie, qui est une voie dégénérative lysosomale impliquée dans le phénomène du mort cellulaire. L'inhibition de l'autophagie a été observée suite à l'inhibition de la Beclin-1 (un médiateur de l'autophagie) (Valentim et al. 2006).

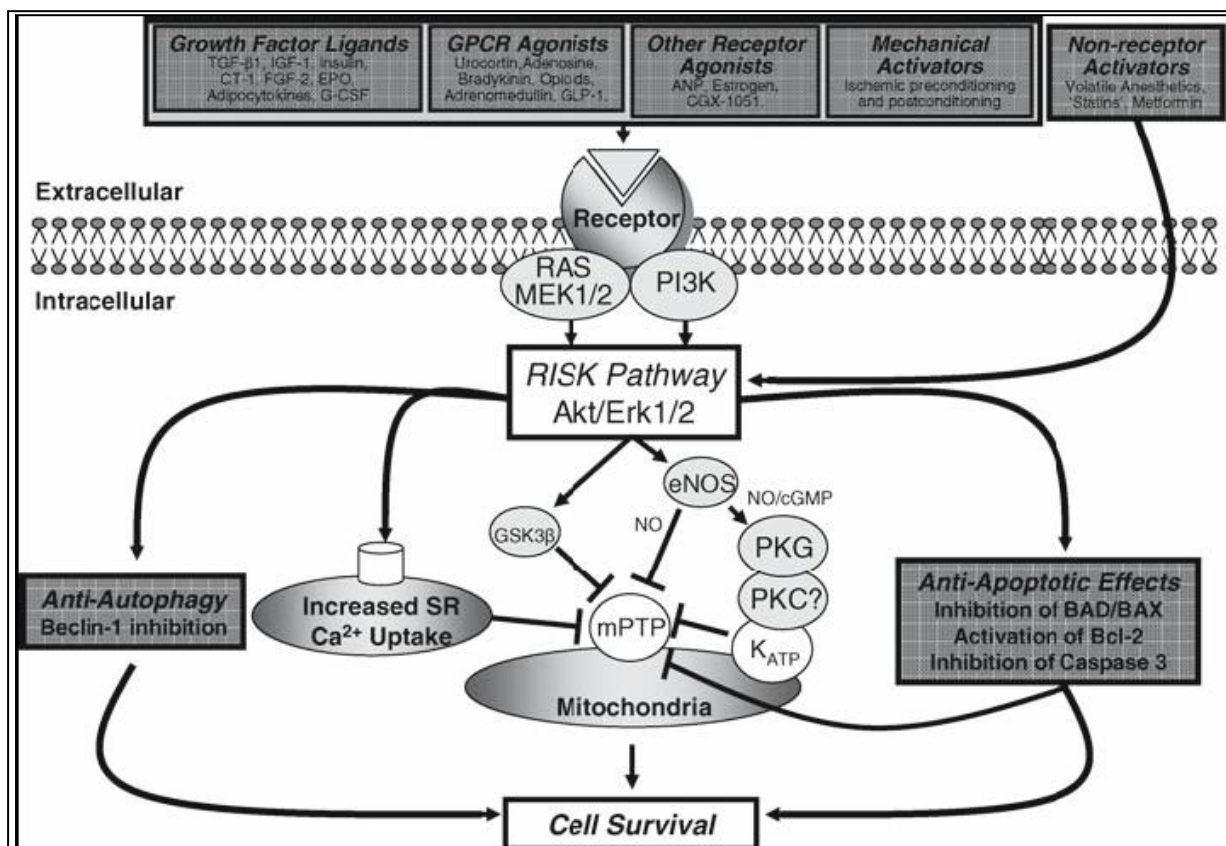


Figure 5 : La voie RISK et ses différents effecteurs (Hausenloy et Yellon. 2007).

Les voies en amont de RISK les mieux caractérisées sont celles activant un récepteur tyrosine kinase et activant des récepteurs couplés aux protéines G. Les activateurs connus de RISK sont l'insuline et certains facteurs de croissance "*Insulin like growth factor*", l'angiotensine II, l'endothéline 1, la phényléphrine (Hausenloy et Yellon. 2004), l'érythropoïétine (Bullard et al. 2005), la bradykinine (Bell et Yellon. 2003) et l'adénosine (Maddock et al. 2002). Le préconditionnement (Hausenloy et al. 2005) et le postconditionnement ischémique (Tsang et al. 2004) activent aussi la voie RISK.

1.2.2. Les activateurs de la voie SAFE

La voie SAFE "*Survivor Activating Factor Enhancement*" est composée de la protéine kinase G (PKG) (Burley et al. 2007 ; Costa et al. 2008), et d'une voie de signalisation impliquant le TNF α "*Tumor necrosis factor alpha*", la sphingosine et

JAK/STAT "Janus Kinases/Signal transducer activator of transcription" (Schulz et Heusch. 2009).

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire présente dans toutes les cellules y compris les cardiomyocytes. L'augmentation du TNF α après une ischémie-reperfusion a été démontrée dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat (Herskowitz et al. 1995). Les souris génétiquement modifiées déficientes en TNF α présentent une protection contre les lésions d'I/R (Maekawa et al. 2002). De plus, l'utilisation des anticorps spécifiques anti-TNF α entraîne une diminution significative de la taille d'infarctus dans un modèle d'IDM in vivo chez le lapin (Belosjorow et al. 2003) et le rat (Gurevitch et al. 1997). De plus, des souris ayant une déficience de l'expression de récepteurs membranaires au TNF α ont eu une réduction de la taille d'infarctus après ischémie-reperfusion (Kurrelmeyer et al. 2000). A l'inverse, une autre étude réalisée sur des cardiomyocytes isolées avait montré que l'utilisation du TNF α avant l'induction de l'hypoxie entraînait une protection contre les lésions d'hypoxie-réoxygénation (Nakano et al. 1998). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par l'existence de différents types de récepteurs au TNF α ; l'activation du récepteur de type 1 entraînerait un effet cardiotoxique alors que le récepteur de type 2 serait responsable des effets cardioprotecteurs (Flaherty et al. 2008). De plus, la concentration du TNF α semble avoir un rôle dans la détermination de son effet néfaste ou cardioprotecteur. Il a été démontré dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat qu'une faible concentration du TNF α exogène administrée avant l'induction de l'ischémie-reperfusion entraînait une réduction de la taille d'infarctus. Cet effet n'a pas été observé en utilisant des doses plus élevées (Deuchar et al. 2007).

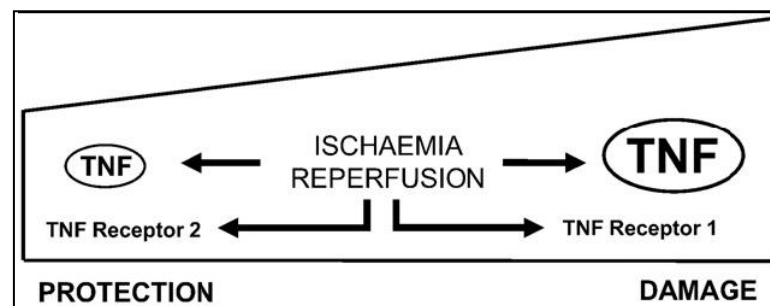


Figure 6 : Rôle du TNF α dans les lésions de reperfusion (Lecour. 2009).

Le mécanisme par lequel TNF α exerce son effet cardioprotecteur passe par l'activation de plusieurs effecteurs tels que la sphingolipide, la protéine kinase C et le

canal K^+_{ATP} mitochondriale. Il a été démontré que l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de ces effecteurs (la N-oleoylethanolamine, la chélérythrine et l'acide 5-hydroxydécanoïque, respectivement) inhibait l'effet cardioprotecteur du $TNF\alpha$ administré avant l'induction de l'ischémie dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé (Lecour et al. 2002). L'inhibition du mPTP, l'activation des canaux potassique (Gao et al. 2005) et la phosphorylation de la $NF\kappa B$ "*Nuclear factor kappa B*", contribuent à la cardioprotection induite par $TNF\alpha$. Cependant, son effet cardioprotecteur semble être indépendant de la voie RISK. L'inhibition de la voie PI3K/Akt et d'ERK1/2 n'entraîne pas une inhibition de l'effet du $TNF\alpha$ sur la réduction de la taille d'infarctus dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé (Lecour et al. 2005).

Après la liaison du $TNF\alpha$ sur son récepteur de type 2, les deux protéines JAKs adjacentes à ce récepteur se phosphorylent et provoquent l'activation des protéines STAT. Les JAKs font parties de la famille des tyrosines kinases qui sont couplées à des récepteurs membranaires. Ils jouent un rôle majeur dans la transduction du signal du cytosol vers le noyau (Boengler et al. 2008). Les STAT appartiennent à la famille des protéines transcriptionnelles. Sept formes ont été identifiées. L'activation des STAT par les JAKs entraîne leur phosphorylation et leur transformation à des formes homodimériques ou hétérodimériques qui seront transloquées dans le noyau et induisent la transcription des gènes (Lecour. 2009). L'activation de la STAT-3 en réponse au $TNF\alpha$ administré avant l'ischémie-reperfusion a été démontrée pour la première fois en 2001, dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé (Negoro et al. 2001). L'utilisation de l'inhibiteur spécifique de la phosphorylation du STAT-3 dans ce modèle, a entraîné une augmentation du taux des cellules apoptotiques, ce qui suggère un rôle cardioprotecteur de cette protéine (Negoro et al. 2001). Plusieurs effecteurs de la STAT-3 ont été identifiés tels que les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL (Lecour. 2009), les facteurs pro-apoptotiques Bad (Lecour et al. 2005) et la connexine 43 mitochondriale qui joue un rôle important dans la cascade de la transduction du signal (Ozog et al. 2004). Bien que STAT-3 soit un facteur de transcription, son effet cardioprotecteur semble être indépendant de son effet transcriptionnel en raison du court délai observé entre son activation et l'induction de la cardioprotection (Lecour. 2009).

La sphingosine est un autre effecteur du TNF α (Thielmann et al. 2002). La relation entre la sphingosine et les autres voies de signalisation cardioprotectrices n'est pas encore identifiée. La sphingosine kinase (SPhK) joue un rôle dans la génération de la sphingosine-1-phosphate (S1P), dans la régulation de la mitose et l'apoptose cellulaire et dans le réarrangement du cytosquelette (Vessey et al. 2006). Les cœurs isolés des souris déficientes en SPhK présentaient un IDM plus large que les souris normales. L'effet cardioprotecteur du postconditionnement ischémique a été inhibé chez ces souris ainsi qu'une inhibition de l'activité d'Akt et d'ERK1/2 en réponse au postconditionnement a été observée (Jin et al. 2008). Il semble que la S1P est formée par la SPhK dans les premières minutes de la reperfusion. La S1P passe dans le milieu extracellulaire et active les récepteur S1P ce qui entraîne une activation des différentes composantes de la voie RISK (Ovize et al. 2010).

L'implication de la voie SAFE a été démontrée dans le préconditionnement ischémique (définis plus loin) (Deuchar et al. 2007), le postconditionnement ischémique (détaillé plus loin) (Lacerda et al. 2009), et d'autres agents pharmacologiques cardioprotecteurs tels que l'érythropoïétine (Rafiee et al. 2005), l'insuline (Fuglestad et al. 2008) et la morphine (Gross et al. 2007).

1.2.2.1. *Cross-talk* entre la voie RISK et la voie SAFE

L'interaction entre les voies RISK et SAFE n'est pas formellement prouvée. Cependant, quelques données ont montré l'existence d'un lien entre les différentes composantes de ces deux voies.

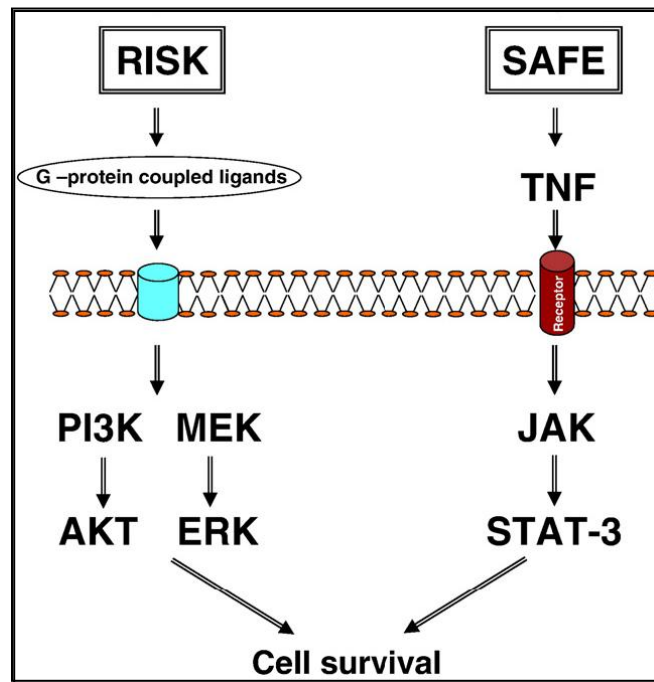


Figure 7 : Les principales composantes de la voie RISK et la voie SAFE (Lecour. 2009).

Pfeffer et al. ont rapporté que la sous-unité p85 de la PI3K pouvait se lier à STAT-3 phosphorylé et par conséquent entraîner la phosphorylation des tyrosines kinase (Pfeffer et al. 1997). Plus récemment Gross et al. ont démontré dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat et sur des cardiomyocytes isolés que la cardioprotection induite par les opioïdes nécessitait l'activation de la voie PI3K/Akt et la voie JAK/STAT-3. La phosphorylation de la STAT-3 était dépendante de l'activité de PI3K dans les deux modèles, et l'inhibition de la voie JAK/STAT-3 par AG490 inhibait la phosphorylation d'Akt (Gross et al. 2006). De plus, le preconditionnement ischémique n'induisait pas la phosphorylation d'Akt dans des cardiomyocytes des souris génétiquement modifiés présentant une déficience en STAT-3 (Suleman et al. 2008). Dans cette même étude les auteurs ont démontré sur des cœurs des rats isolés que l'inhibition de la voie PI3K/Akt par la Wortmannin inhibait la phosphorylation de STAT-3 induite par le preconditionnement. L'utilisation de l'AG490 inhibait aussi la capacité du preconditionnement à phosphoryler Akt (Suleman et al. 2008). Dans un contexte éloigné des lésions de reperfusion, Frias et al. ont démontré que la prostaglandine E2 (PGE2) induisait la phosphorylation du STAT-3 en passant par l'activation d'ERK1/2. L'inhibition d'ERK1/2 par l'U0126 avait

inhibé la phosphorylation du STAT-3 en réponse à la PGE2 dans un modèle de cardiomyocytes isolés de ventricules des rats nouveau-nés (Frias et al. 2007).

1.2.3. Les inhibiteurs du mPTP

L'ouverture du mPTP est inhibée par la cyclosporine A (CsA) ou la sanglifehrine A (SfA). La CyP-D est la cible de la CsA. Une fois la CsA couplée à la Cyp-D, elle entraîne l'inhibition de l'activité de sa sous-unité isomérase inhibant la liaison CyP-D/ANT au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, ce qui provoque une inhibition de l'ouverture du mPTP (Clarke et al. 2002). La CsA est aussi un inhibiteur de la calcineurine. La calcineurine est une protéine phosphatase impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires importantes, notamment l'homéostasie calcique (Crabtree. 2001). Elle peut être impliquée dans le mécanisme de la cardioprotection induite par la CsA. Cependant, l'effet cardioprotecteur des analogues de la CsA qui inhibent l'isomérase du CyP-D et non pas la calcineurine a été démontré (Griffiths et Halestrap. 1995). La SfA est un analogue de la CsA non inhibiteur de la calcineurine, elle se lie à la CyP-D et inhibe la liaison à CyP-D/ANT (Clarke et al. 2002).

Plusieurs études expérimentales et cliniques ont démontré le rôle majeur de l'inhibition du mPTP dans une stratégie de cardioprotection contre les lésions de reperfusion. Hausenloy et al. ont démontré que l'utilisation de la CsA au moment de la reperfusion entraînait une réduction de plus de 50% de la taille d'infarctus (Hausenloy et al. 2003). Un résultat équivalent a été observé avec l'utilisation de la SfA (Shanmuganathan et al. 2005). Dans cette étude, des cellules atriales trabéculaires humaines ont été soumises à une hypoxie-réoxygénation. L'utilisation de la CsA ou de la SfA à la réoxygénation a permis d'améliorer la contractilité basale et la viabilité cellulaire (Shanmuganathan et al. 2005). D'autre part, une protection contre les lésions de reperfusion a été rapportée chez des souris ayant une déplétion du gène codant pour la CyP-D (Baines et al. 2005). Les souris ayant une surexpression de ce gène présentaient un taux élevé de cardiomyocytes apoptotiques et un œdème au niveau de la mitochondrie après I/R (Baines et al. 2005).

Récemment l'effet cardioprotecteur de la CsA a été démontré dans une étude clinique réalisée sur 58 patients reperfusés par PCI à la phase aiguë d'un IDM. Ces patients étaient randomisés dans deux groupes ; un groupe CsA pour lequel une injection intraveineuse de la CsA a été réalisée au moment de la reperfusion et un autre groupe contrôle pour lequel une solution saline a été injectée. Le délai de reperfusion, la taille de l'aire à risque et la fraction d'éjection avant PCI étaient comparable dans les deux groupes. Les résultats ont montré une diminution du taux de la créatinine kinase (CK) dans le groupe CsA et une diminution de la masse absolue de tissu infarcté mesurée par MRI "*magnetic resonance imaging*" 5 jours après la reperfusion (Piot et al. 2008).

Plus récemment, cet effet cardioprotecteur de la CsA n'a pas été retrouvé chez le porc. Dans ce travail la CsA administrée 5 minutes avant la reperfusion n'a pas réduit la taille d'infarctus (Lie et al. 2010).

Un essai clinique large ayant pour objectif d'apprécier l'effet de la CsA sur des critères de morbi-mortalité est programmé (étude CIRCUS "*does Cyclosporine Improve Clinical Outcome in ST elevation myocardial infarction*").

1.2.3.1. Rôle de la glycogène synthase kinase (GSK-3 β)

La GSK-3 β est une protéine multifonctionnelle jouant un rôle essentiel dans l'inhibition du mPTP. La forme phosphorylée de la GSK-3 β est sa forme inhibée ; c'est cette forme qui est capable d'inhiber l'ouverture du mPTP et donc induire la cardioprotection (Juhaszova et al. 2004). Le mécanisme par lequel la phospho-GSK-3 β inhibe le mPTP n'est pas bien identifié. Pour étudier ce mécanisme moléculaire il est important d'examiner la localisation intracellulaire de la GSK-3 β et son interaction avec le mPTP avant et après l'ischémie-reperfusion. Cela a été testé par Nishihara et al. dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé, dans lequel ils ont démontré la prédominance cytosolique du GSK-3 β à l'état basal et l'augmentation de taux du GSK-3 β mitochondrial après ischémie-reperfusion. La co-immunoprécipitation de la GSK-3 β avec les deux composantes du mPTP, la VDAC et l'ANT, augmente de 50% après la reperfusion ce qui implique la liaison du GSK-3 β au mPTP suite à la

reperfusion. Après administration d'un agent cardioprotecteur qui induit la phosphorylation de la GSK-3 β à la reperfusion, la liaison phospho-GSK-3 β /ANT augmente induisant une diminution de la liaison CyP-D/ANT, ce qui inhibe l'ouverture du mPTP (Nishihara et al. 2007).

II. La cardioprotection mécanique

2.1. Concept du préconditionnement

Le concept du préconditionnement a été décrit pour la première fois en 1986 (Murry et al. 1986). Des occlusions coronariennes brèves (trop courtes pour provoquer une nécrose myocytaire) réalisées avant une occlusion prolongée (de durée suffisante pour provoquer un infarctus myocardique) réduisaient de façon importante (50% à 75%) la taille finale de l'infarctus. Le fait de rendre le myocarde brièvement ischémique induit une protection endogène qui s'exprime lors d'une ischémie prolongée consécutive. Ce phénomène a été nommé préconditionnement. Tout se passe comme si le myocarde, «prévenu» par une première agression (ici de nature ischémique), mettait en jeu des mécanismes endogènes de défense le rendant capable de mieux tolérer une nouvelle agression à venir : il s'agit là d'un phénomène d'adaptation au stress.

L'ischémie n'est pas le seul stimulus capable d'induire cette cardioprotection. L'hypoxie, le stress thermique, la stimulation par pacing, l'étirement myocardique sont susceptibles d'activer ces mécanismes de défense. De nombreux agents pharmacologiques peuvent mimer ce phénomène dans certains modèles expérimentaux : agonistes A₁/A₃ à l'adénosine, bradykinine, opioïdes, angiotensine II, noradrénaline ou endothéline (Argaud et Ovize. 2004; Valen et Vaage. 2005).

Le mécanisme du préconditionnement est biphasique ; on distingue le préconditionnement précoce et le préconditionnement tardif. Le préconditionnement précoce est initié dès la première minute, son effet dure 2-3 heures, alors que le

préconditionnement tardif est initié 24 heures après le stimulus et son effet dure 72-96 heures après l'initiation de l'ischémie. Les deux mécanismes impliqués dans ces deux phases du preconditionnement ne sont pas les mêmes (Das M. et Das DK. 2008). De très nombreux travaux se sont attachés à préciser les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le preconditionnement précoce. Les récepteurs du sarcolemme (comme ceux de l'adénosine (A_1/A_3), de la bradykinine, de l'angiotensine, de l'endothéline, les canaux potassiques dépendants de l'ATP (K^+_{ATP}) et les récepteurs sensibles à l'étirement) peuvent être impliqués dans la transmission du signal. Mais cette transmission peut aussi ne pas les impliquer directement, comme lors de l'induction du preconditionnement par des radicaux libres de l'oxygène, le NO, le calcium exogène. La protéine kinase C (PKC) semble participer à la médiation du preconditionnement. La PKC a deux isoformes impliqués dans les lésions de reperfusion : la PKC δ et la PKC ϵ . Il a été démontré que la PKC δ subit une translocation rapide dans la mitochondrie dans les 5 minutes qui suivent la reperfusion (Churchill et Szweda. 2005). Cela a été associé avec une augmentation de la génération du superoxyde d'oxygène, une perturbation des fonctions mitochondriales et une augmentation de la libération du cytochrome C et d'autres facteurs pro-apoptotiques (Murriel et al. 2004). Contrairement à la PKC δ , la PKC ϵ a un effet cardioprotecteur contre les lésions de reperfusion. Son implication dans le mécanisme de la cardioprotection induit par le preconditionnement a été démontrée. Une fois activée, la PKC ϵ induit l'ouverture du pore K^+_{ATP} mitochondrial durant l'ischémie (Sato et al. 1998). La régulation du pore K^+_{ATP} par la PKC ϵ a été démontrée sur des cardiomyocytes isolés (Sato et al. 1998) et dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé (Wang et al. 2001). Le mécanisme par lequel cette régulation du pore K^+_{ATP} provoque la tolérance à l'ischémie n'est pas identifié. Des antagonistes de la PKC ϵ (chélérythrine, staurosporine...) abolissent la limitation de taille de l'infarctus consécutive au preconditionnement, tandis que les activateurs de la PKC ϵ reproduisent cet effet bénéfique. Les tyrosines kinases (TK) et les MAPK (en particulier p38MAPK, mais aussi ERK1/2, JNK, Akt et P70S6K) peuvent également participer à la signalisation du preconditionnement (Argaud et Ovize. 2004).

L'effet du preconditionnement tardif passe par les voies de signalisation déjà mentionnées mais il dépend essentiellement d'une activation génomique et de la

synthèse des nouvelles protéines comme la iNOS (*Inductible Nitric Oxide Synthase*), la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), le superoxyde de manganèse dismutase et probablement les protéines du choc thermique (*Heat Shock Protein*, Hsp) (Bolli. 1996 ; Das M. et Das DK. 2008).

Le phénomène de préconditionnement a cependant des limites temporelles. D'une part, la protection qui se met en place dans les quelques minutes qui suivent la stimulation inductrice n'est efficace que si le myocarde, en cours d'infarctissement après occlusion coronaire, est reperfusé suffisamment tôt. Si la reperfusion ne survient pas, les cardiomyocytes mourront quoi que l'on fasse. D'autre part, s'il s'écoule trop de temps entre le stimulus inducteur et la survenue de l'infarctus, la protection disparaît. En d'autres termes, la protection induite est transitoire. Elle peut cependant être induite de nouveau si l'on répète le stimulus initial (Argaud et Ovize. 2004). Enfin, son application clinique est nulle dans le contexte de l'IDM, par nature imprévisible.

Il est donc apparu très clairement que l'intérêt n'était pas dans un quelconque mimétisme clinique, mais plutôt dans l'identification des mécanismes moléculaires du phénomène, la définition de nouvelles cibles pharmacologiques menant secondairement au développement de médicaments cardioprotecteurs.

2.2. Le postconditionnement ischémique

2.2.1. Définition

Alors que le préconditionnement ischémique est induit par la réalisation d'épisodes brefs d'ischémie-reperfusion avant une ischémie prolongée infarctoïde, Zhao et al. en 2003, ont eu l'idée de réaliser ces épisodes non pas avant l'ischémie prolongée, mais juste après, au moment de la reperfusion du myocarde infarci (Zhao

et al. 2003). D'une façon très surprenante, ils ont montré que cette manœuvre permet une réduction de la taille d'infarctus comparable à celle du préconditionnement, attribuant cet effet à une limitation de la production de radicaux libres de l'oxygène lors de la phase de reperfusion. Ils venaient de mettre en évidence le phénomène du postconditionnement ischémique (IPost).

Cette observation, qui va bien au-delà de la simple manipulation de protocole au laboratoire, présente des implications potentielles majeures. En effet, elle correspond à une situation clinique courante, la reperfusion à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde.

Il est important de noter que le IPost doit être réalisé immédiatement à la reperfusion, au delà l'effet protecteur disparaît (Tsang et al. 2005).

2.2.2. Effet cardioprotecteur du postconditionnement

Plusieurs travaux ont démontré que le IPost avait un effet cardioprotecteur :

- a. Amélioration des performances cardiaques après la reperfusion. Plusieurs études expérimentales ont démontré la capacité de IPost à améliorer les paramètres hémodynamiques après la reperfusion (Kin et al. 2004 ; Kin et al. 2005).
- b. Limitation de la taille de la zone infarctée. Cet effet a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux avec des protocoles variables (Zhoa et al ; 2003 ; Tsang et al. 2004 ; Kin et al. 2005 ; Kin et al. 2004 ; Yang et al. 2004 ; Yang et al. 2005).
- c. Effet anti-apoptotique. Effet démontré notamment sur des cardiomyocytes isolés soumis à 3 cycles de 5 min d'hypoxie/réoxygénation, après une longue période d'hypoxie (Sun et al. 2006).
- d. Effet anti-arythmique. Galagudza et al. ont démontré dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé que l'application d'un IPost (1 cycle de 2 minutes

d'ischémie globale suivis d'une reperfusion) permet de prévenir la survenue des tachyarythmies induites par la reperfusion (Galagudza et al. 2004).

2.2.3. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du IPost passerait par une voie passive et une voie active (Figure 8) :

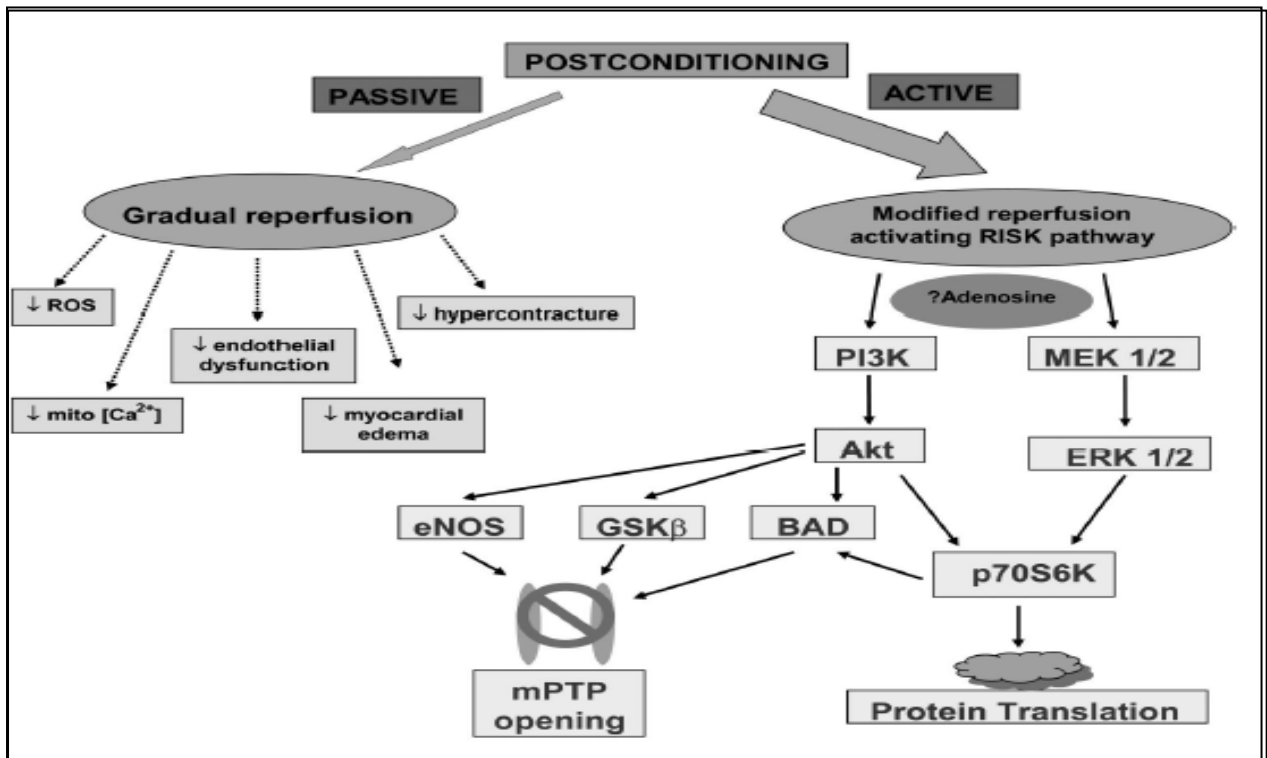


Figure 8 : Le mécanisme d'action du postconditionnement (Tsang et al. 2005).

La voie passive diminuerait :

- la formation des radicaux libres (*reactive oxygen species* : ROS) (Sun et al. 2006 ; Kin et al. 2004 ; Kin et al. 2005);
- le flux calcique mitochondrial (Sun et al. 2006);
- le dysfonctionnement endothélial (Zhao et al. 2003);
- la formation d'œdème myocardique et l'accumulation de neutrophiles (Zhao et al. 2003 ; Kin et al. 2004 ; Kin et al. 2005).

La voie active impliquerait :

- a. L'activation des récepteurs à l'adénosine. Kin et al. ont démontré que l'administration de l'adénosine pouvait entraîner un postconditionnement pharmacologique en activant les récepteurs A_{2A} ou A_3 mais pas A_1 (Kin et al. 2005). L'hypothèse de l'implication d'autres récepteurs tels que les récepteurs à la bradykinine, à l'érythropoïétine ou les récepteurs adrénergiques reste à identifier (Gross ER et Gross GJ. 2006). Cependant le rôle des récepteurs aux opioïdes a été démontré récemment par Zatta et al. qui ont montré que l'inhibition des ces récepteurs pouvait entraîner une inhibition de l'effet cardioprotecteur du IPost (Zatta et al. 2008).
- b. L'implication des canaux K^+_{ATP} . L'inhibition de ces canaux par la glibenclamide ou le 5-hydroxydécanoate inhibe l'effet cardioprotecteur du IPost (Yang et al. 2004). Des hypothèses suggèrent que la liaison des ligands impliqués dans la cardioprotection sur leurs récepteurs spécifiques active des cascades de voies de signalisation qui agissent au niveau de la mitochondrie en permettant l'ouverture des canaux K^+_{ATP} . Cette ouverture entraînerait la génération des radicaux libres par la mitochondrie qui activeraient des kinases cardioprotectrices (Yellon et Downey. 2003) ou inhiberaient l'ouverture du mPTP (Costa et al. 2006).
- c. La protéine kinase C (PKC) semble jouer un rôle dans le mécanisme du IPost (Zatta et al. 2006). L'inhibition sélective de la $PKC\epsilon$ a inhibé l'effet cardioprotecteur du IPost (3 cycles de 10 sec d'ischémie suivie de 10 sec de reperfusion) dans un modèle d'I/R chez le rat. Dans ce travail le taux de la phospho- $PKC\epsilon$ augmentait après IPost. De plus, IPost inhibait la translocation de la $PKC\delta$ dans la mitochondrie. IPost peut donc moduler la PKC au moment de la reperfusion en augmentant la phosphorylation et la translocation de la $PKC\epsilon$ et en inhibant la translocation de la $PKC\delta$. Ce concept d'implication de la PKC dans le mécanisme du IPost est à mettre en parallèle avec les hypothèses d'implication de l'adénosine et des opioïdes, étant donné que ces médiateurs endogènes activent également la $PKC\epsilon$.
- d. L'activation de la voie RISK, avec les deux composantes: la voie PI3K/Akt et

la voie MAPK (Tsang et al. 2004). La phosphorylation d'Akt permet la phosphorylation de plusieurs autres protéines, notamment P70S6K et eNOS "*endothelial nitric oxide synthase*" (Yang et al. 2004 ; Tsang et al. 2005). ERK1/2 semble être aussi impliqué dans le mécanisme de cardioprotection (Darling et al. 2005). L'implication de la voie RISK dans le mécanisme du IPost n'a pas été retrouvée dans une étude réalisée sur un modèle d'IDM chez le porc (Skyschally et al. 2009). Dans cette étude les auteurs ont démontré que IPost (6 cycles de 20 sec d'ischémie suivies de 20 sec de reperfusion) entraînait une diminution significative de la taille d'infarctus sans être associé à une augmentation significative de la phosphorylation d'Akt, d'ERK1/2 et de la GSK-3 β . De plus l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la voie PI3K/Akt et d'ERK1/2 inhibait la phosphorylation d'Akt, d'ERK1/2 et de la GSK-3 β sans inhiber l'effet du IPost sur la réduction de la taille d'infarctus (Skyschally et al. 2009).

- e. L'implication de la voie SAFE, avec les deux composantes la TNF α et la STAT-3 (Boengler et al. 2008). Dans des cœurs isolés provenant des souris génétiquement déficients en TNF α ou des cardiomyocytes isolés des souris ayant une déficience génétique en STAT-3, IPost n'entraînait pas une diminution de la taille d'infarctus après la reperfusion. De plus, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques des voies PI3K/Akt et ERK1/2 (composantes de la voie RISK) n'inhibait pas l'effet cardioprotecteur du IPost, alors que l'inhibiteur de la STAT-3 inhibait cet effet. Le récepteur du TNF α qui semble être impliqué dans la cardioprotection induite par IPost est le récepteur type 2. Dans les cœurs isolés des souris génétiquement déficients pour ce récepteur, la cardioprotection était inhibée alors qu'elle était maintenue en cas de déficience pour le récepteur de type 1 (Lacerda et al. 2009).

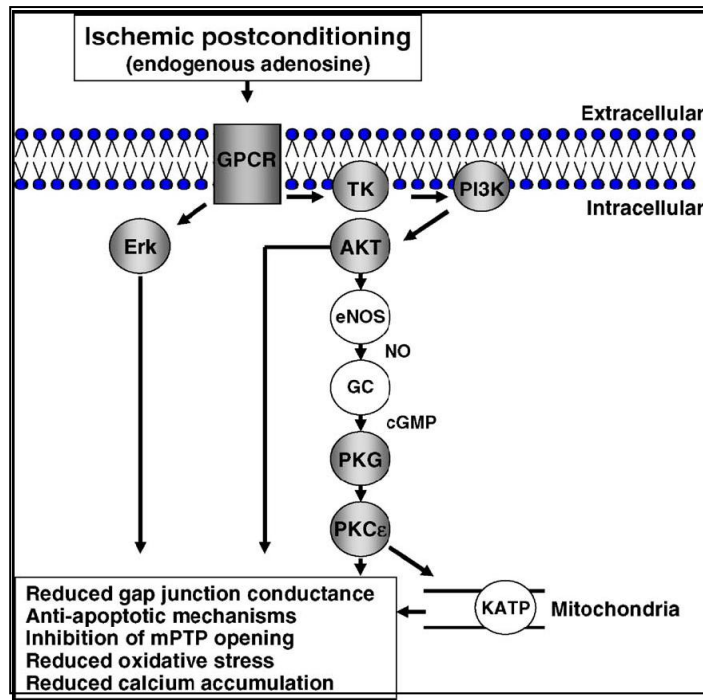


Figure 9 : Récapitulatif des principales voies de signalisation impliquées dans le mécanisme du IPost. La génération de l'adénosine par le IPost entraîne une activation de plusieurs kinases telles que Akt, ERK1/2 et PKG (protéine kinase G). L'implication de la tyrosine kinase (TK) dans le mécanisme n'est pas jusqu'à présent démontré. GPCR, récepteur couplé à la protéine G; GC, guanylate cyclase (Hausenloy et Yellon, 2006).

L'activation des voies de signalisation par IPost semble converger au mPTP. Arguand et al. ont démontré dans un modèle d'infarctus chez le lapin que IPost entraînait une inhibition de l'ouverture du mPTP durant les premières minutes de la reperfusion (Arguand et al. 2005). L'implication de ce pore a été aussi démontrée dans une autre étude qui a évalué le rôle de la GSK-3 β dans le mécanisme d'action du IPost. Dans cette étude, des souris transgéniques chez lesquelles la phosphorylation de la GSK-3 β est impossible ont été utilisées. Les résultats ont montré que le mécanisme d'action du IPost nécessitait la phosphorylation de la GSK-3 β et donc l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Gomez et al. 2008). A l'inverse, Nishino et al. ont démontré que l'inhibition de la GSK-3 β n'était pas importante dans le mécanisme de la cardioprotection induite par le IPost dans un modèle d'IDM chez les souris (Nishino et al. 2008).

2.2.4. Implication clinique

En 2005, Staat et al. ont testé l'effet cardioprotecteur du IPost dans une étude clinique réalisée chez des patients ayant un IDM. Les patients inclus dans cette étude avaient un IDM avec une élévation du segment ST, présentaient une douleur thoracique depuis moins de 6 heures et étaient traités par PCI. Ils ont été partagés d'une façon aléatoire dans 2 groupes : un groupe contrôle et un groupe IPost. Dans les 2 groupes la reperfusion a eu lieu en introduisant un ballon dans l'artère coronaire occlus suivis d'une implantation du stent. Dans le groupe contrôle aucune autre intervention supplémentaire n'a eu lieu. Dans le groupe IPost, le ballon a été dégonflé et gonflé quatre fois de suite dans la première minute de la reperfusion. Puis une reperfusion totale a eu lieu comme chez les patients contrôles. L'analyse du taux de créatinine kinase (CK) dans les 72 heures qui suivaient la reperfusion a été utilisée comme marqueur de la taille d'infarctus. IPost a significativement réduit la taille d'infarctus ainsi que l'aire sous la courbe des CK libérés dans les 72 heures après la reperfusion. À noter que la durée de l'ischémie, facteur majeur dans la détermination de la taille d'infarctus, était comparable dans les 2 groupes (Staat et al. 2005).

Malgré cette étude préliminaire suggérant l'effet cardioprotecteur du IPost chez l'homme, plusieurs questions restent posées avant de valider son utilisation dans la prévention des lésions de reperfusion (Thibault et al. 2007) :

- a. le protocole du IPost utilisé est-il le meilleur de point de vue rapidité, sécurité et efficacité ?
- b. est-ce qu'une co-médication des patients coronariens peut modifier la cardioprotection induite par le IPost ?
- c. est-ce que la présence des comorbidités peut altérer cette cardioprotection ?
- d. IPost peut-il avoir le même effet cardioprotecteur chez des patients qui se présenteraient avec une reperfusion partielle ?

De plus, l'utilisation du IPost reste limitée aux patients reperfusés par PCI. Dans le cas d'une reperfusion par des thrombolytiques, l'utilisation du IPost est impossible. Il est donc indispensable de trouver un agent pharmacologique capable de mimer l'effet cardioprotecteur du IPost et qui pouvait être utilisé au moment de la reperfusion chez la plupart des patients atteints d'un IDM, quelque soit la stratégie de reperfusion utilisée.

Cette question a été l'objectif de la première partie du travail. Nous avons comparé l'effet cardioprotecteur du IPost à celui d'un agent pharmacologique (l'érythropoïétine), administré au moment de la reperfusion, dans un même modèle expérimental.

2.3. Le conditionnement à distance

On distingue trois types de conditionnement à distance. La classification est faite en fonction du temps d'initiation des séquences d'ischémie/reperfusion au niveau d'un organe à distance du cœur :

- avant l'induction de l'ischémie myocardique : le préconditionnement à distance;
- durant l'ischémie myocardique : le perconditionnement à distance;
- à la fin de l'ischémie myocardique : le postconditionnement à distance.

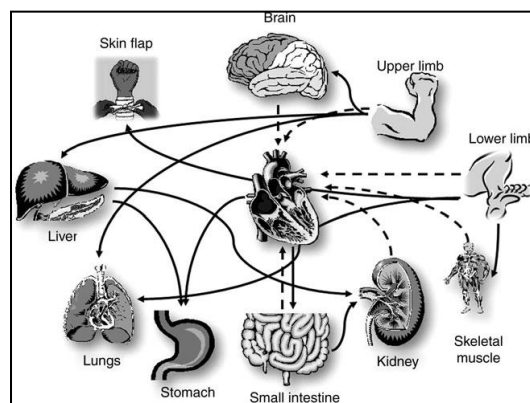


Figure 10 : Protection inter-organe contre les lésions de reperfusion myocardique (Hausenloy et Yellon. 2008).

2.3.1. Description

2.3.1.1. Le préconditionnement à distance

Le préconditionnement à distance (ou "*remote preconditioning*", RIPC) a été découvert pour la première fois par Przyklenk et al. en 1993. Dans ce travail, de brèves occlusions de la coronaire circonflexe, réalisées avant une occlusion prolongée de l'IVA (coronaire interventriculaire antérieure) avaient diminué la taille de l'infarctus dans le territoire de l'IVA (Przyklenk et al. 1993). Cette forme de cardioprotection intra-myocardique a été ensuite étendue à d'autres organes à distance du cœur. Plusieurs études expérimentales ont démontré la cardioprotection induite par le RIPC appliqué au niveau de l'intestin grêle (Gho et al. 1996), du rein (Pell et al. 1998) ou d'un membre (Oxman et al. 1997). Gho et al. ont démontré dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat qu'une occlusion de 15 minutes de l'artère mésentérique réalisée 10 minutes avant l'induction de l'ischémie myocardique, entraînait une diminution significative de la taille d'infarctus (Gho et al. 1996). Une diminution significative de la taille d'infarctus a été aussi observée en appliquant un cycle de 10 minutes d'ischémie/10 minutes de reperfusion au niveau de l'artère rénale. Ce cycle a été réalisé 20 minutes avant l'induction de l'ischémie myocardique dans un modèle d'IDM in vivo chez le lapin (Pell et al. 1998). Oxman et al. ont réalisé une séquence de 10 minutes d'ischémie au niveau du membre inférieur chez le rat à l'aide d'un tourniquet avant de prélever le cœur pour le perfuser selon la technique de Langendorff et l'exposer à une ischémie-reperfusion. Le préconditionnement à distance ainsi induit a permis de prévenir les arythmies de reperfusion (Oxman et al. 1997).

2.3.1.2. Le perconditionnement à distance

Ce concept a été introduit par Schmidt et al. (Schmidt et al. 2007). Ils ont réalisé dans un modèle d'IDM in vivo chez le porc 4 cycles de 5 minutes d'ischémie/5 minutes reperfusion, au niveau d'un membre inférieur, durant l'ischémie

myocardique. Le preconditionnement appliqué dans leur modèle a entraîné une réduction significative de la taille d'infarctus, une préservation des fonctions systolique et diastolique et une protection contre les arythmies de reperfusion (Schmidt et al. 2007).

2.3.1.3. Le postconditionnement à distance

L'effet cardioprotecteur du postconditionnement à distance (ou "*remote postconditioning*", RIPC) a été démontré pour la première fois par Kerendi et al. (Kerendi et al. 2005). Ils ont réalisé dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat un épisode de 5 minutes d'ischémie/5 minutes reperfusion au niveau de l'artère rénale, en fin d'ischémie myocardique (ce cycle a eu lieu juste avant la reperfusion du myocarde). Le RIPC dans leur modèle a entraîné une diminution de 50% de la taille d'infarctus et une réduction de la libération des marqueurs plasmatique de nécrose. Cette cardioprotection induite par le RIPC n'existait pas si l'artère rénale n'était pas reperfusée ou reperfusée après la reperfusion myocardique (Kerendi et al. 2005). Plusieurs autres études expérimentales ont démontré l'existence de l'effet cardioprotecteur en appliquant ces épisodes d'I/R au niveau d'autres organes (Li et al. 2006 ; Andreka et al. 2007 ; Xu et al. 2009). Li et al. ont démontré l'effet cardioprotecteur du RIPC chez le lapin. Dans cette étude le RIPC a été induit par une occlusion de l'artère fémorale durant 5 minutes suivie d'une reperfusion d'une minute avant la reperfusion myocardique. Une diminution de la taille d'infarctus, du taux plasmatique de CK, du taux du malondialdéhyde plasmatique et de l'accumulation des neutrophiles au niveau de la zone ischémique a été observée en appliquant le RIPC (Li et al. 2006). Anderka et al. ont démontré une diminution de la taille d'infarctus suite à l'application d'un RIPC chez le porc. Le protocole du RIPC utilisé dans cette étude était formé de 4 cycles de 5 minutes ischémie/5 minutes reperfusion réalisés en fin d'ischémie myocardique, au niveau du membre inférieur et à l'aide d'un brassard à tension (Andreka et al. 2007).

Étant donné son caractère non invasif et sa facilité de mise en œuvre, l'effet cardioprotecteur induit par le RIPC au niveau d'un membre a des perspectives cliniques séduisantes.

2.3.2. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action du RIpost n'est pas encore identifié. La découverte des mécanismes d'action impliqués dans la cardioprotection du RIPC servira à comprendre ceux du RIpost, comme cela a été le cas avec le préconditionnement et le IPost classiques.

Des études récentes suggèrent que les mécanismes impliqués dans la cardioprotection du conditionnement à distance pouvaient être similaire à ceux du préconditionnement et IPost classiques (Hausenloy et Yellon 2007). Cependant, les métabolites de transmission du message de l'organe à distance au myocarde ne sont pas identifiés. Plusieurs hypothèses suggèrent une implication des facteurs humoraux, une implication neuronale et un effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique systémique (Figure 11).

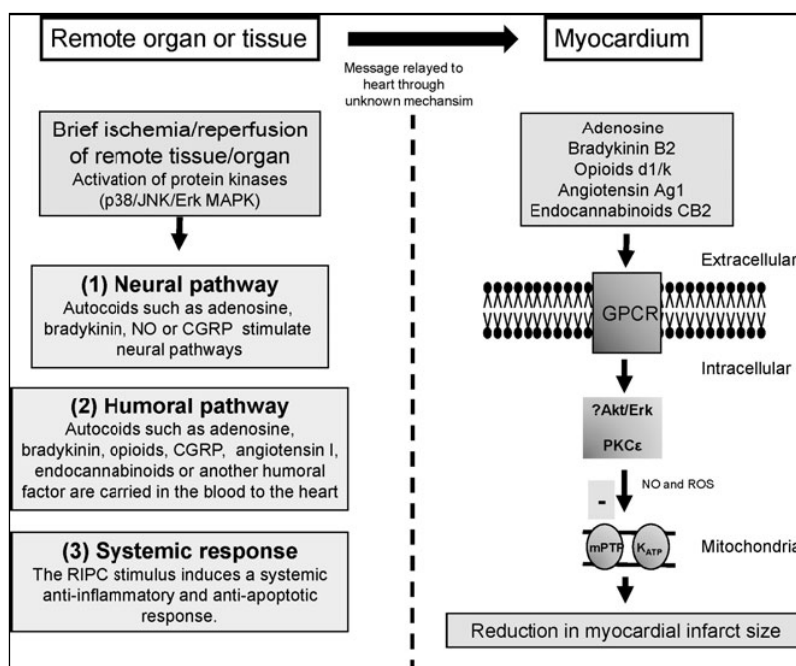


Figure 11 : Les potentiels mécanismes d'action responsable de la cardioprotection induite par le conditionnement à distance (Hausenloy et Yellon. 2008).

Une étude récente a mis en évidence le rôle des agents circulants dans le mécanisme de la cardioprotection induite par le RIPC (Konstantinov et al. 2005).

Dans cette étude des porcs ont été soumis à un RIPC (4 cycles de 5 minutes d'ischémie suivis de 5 minutes de reperfusion réalisés au niveau d'un membre inférieur). Une transplantation cardiaque a été réalisée chez ces porcs. Les porcs donneurs n'étaient pas soumis à un RIPC. L'IDM a été réalisé après la transplantation. Une diminution de la taille d'infarctus a été remarquée dans le groupe de porcs ayant bénéficié d'un RIPC avant transplantation. Cette étude suggère la présence d'effecteurs circulants contribuant à la cardioprotection induite par le RIPC et exclut un mécanisme neuronal afférent (Konstantinov et al. 2005).

3.2.2.1. Implication des facteurs humoraux

Plusieurs études expérimentales ont rapporté l'implication de facteurs humoraux tels que :

- a. les opioïdes. Patel et al. ont rapporté l'implication des récepteurs opioïdes, en démontrant l'inhibition de la cardioprotection induite par le RIPC intestinale chez le rat en présence du naloxone, un antagoniste aux récepteurs opioïdes (Patel et al. 2002).
- b. les endocannabinoïdes. Les antagonistes pharmacologiques des récepteurs à l'endocannabinoïde (CB2) inhibent aussi l'effet cardioprotecteur du RIPC intestinale (Hajrasouliha et al. 2008).
- c. l'implication de la noradrénaline (Oxman et al. 1997) et de l'angiotensine I (Singh et al. 2004) a été aussi rapportée, mais leur mécanisme d'action n'est pas établi.

3.2.2.2. Implication neuronale

Une étude expérimentale a démontré que la réduction de la taille d'infarctus myocardique par un préconditionnement appliqué au niveau de l'artère mésentérique antérieure peut être inhibée en présence des bloqueurs ganglionnaires tel que l'hexamethonium (Gho et al. 1996). Cette hypothèse est étayée par l'existence de substances endogènes comme l'adénosine (Pell et al. 1998), la bradykinine (Schoemaker et van Heijningen. 2000) ou la CGPR "*calcitonin gene-related peptide*" (Tang et al. 1999), pouvant être libérées par l'organe préconditionné à distance et

induire la stimulation de fibres nerveuses afférentes. Le signal nerveux ainsi transmis aux fibres nerveuses efférentes pourrait transmettre un signal de protection au myocarde. Le rôle de l'adénosine dans le mécanisme de la cardioprotection induite par le RIPost a été mis en évidence par Kerendi et al. dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat (Kerendi et al. 2005). Dans cette étude l'utilisation de l'inhibiteur des récepteurs à l'adénosine (le SPT) inhibait l'effet cardioprotecteur de 5 minutes d'ischémie suivis d'une minute de reperfusion appliqué au niveau de l'artère rénale, juste avant la reperfusion myocardique. L'adénosine semble être libérée par le rein puis emportée par la circulation systémique après la reperfusion rénale jusqu'au myocarde. L'élimination de cette phase de reperfusion rénale inhibait l'effet cardioprotecteur du RIPost. Les auteurs dans cette étude suggèrent un rôle indirect de l'adénosine qui passe par la stimulation de la libération d'autres substances cardioprotectrices telles que les kinines et les prostacyclines (Kerendi et al. 2005).

3.2.2.3. Effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique

Plusieurs études expérimentales ont examiné l'effet du RIPC sur la transcription des gènes au niveau du myocarde (Konstantinov et al. 2005) et sur la réponse inflammatoire (Peralta et al. 2001). Konstantinov et al. ont démontré que la simple application de 6 cycles de 4 minutes d'ischémie suivis de 4 minutes de reperfusion, au niveau de l'artère fémorale, entraînait un changement de l'expression des gènes myocardiques. Ils ont rapporté que l'application de ces cycles induisait l'expression de gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif (tels que *Hadhsc*, *Prdx4* et *Fabp4*) et dans la cytoprotection (*Hsp73*). De plus, les gènes pro-inflammatoires (tels que *Egr-1*, *Dusp 1* et *6*) étaient inhibés (Konstantinov et al. 2005). Peralta et al. ont démontré que l'application d'un RIPC au niveau du foie inhibait la réponse inflammatoire dans des organes à distance. Cet effet était associé à une diminution de la régulation de la P-sélectine, à une prévention de l'infiltration de neutrophiles et par conséquent une diminution du stress oxydant. L'inhibition de la libération systémique du TNF à partir des cellules hépatique semble également être impliquée dans ce mécanisme (Peralta et al. 2001).

3.2.2.4. Le mécanisme au sein du myocarde

Une fois le signal cardioprotecteur transmis de l'organe préconditionné à distance vers le cœur, plusieurs voies de signalisation intracellulaires semblent être recrutées au niveau des cardiomyocytes. Ces voies sont probablement similaires à celles intervenant dans le mécanisme d'action du préconditionnement (Yellon et Downey. 2003) et du postconditionnement classiques (Vinten-Johansen. 2007). Il s'agit des ligands des récepteurs couplés à la protéine G tels que l'adénosine (Pell et al. 1998), la bradykinine (Schoemaker et van Heijningen. 2000), les opioïdes (Patel et al. 2002), l'angiotensine (Singh et al. 2004) et les endocannabinoïdes (Hajrasouliha et al. 2008). La liaison de ces substances à leurs récepteurs spécifiques déclenche l'activation de plusieurs kinases intracellulaires et d'autres molécules impliquées dans le mécanisme de cardioprotection :

- a. Les études expérimentales ont suggérées l'implication de l'activation de la PKC dans le phénomène du RIPC en démontrant l'inhibition de son effet cardioprotecteur après inhibition de la PKC par la chélérythrine (Wolfrum et al. 2002 ; Weinbrenner et al. 2002).
- b. L'implication du monoxyde d'azote (NO) dans la cardioprotection induite par le RIPC n'est pas bien déterminée. Les résultats des études expérimentales exploitant son implication par utilisation des inhibiteurs de la NO synthase ont donné des résultats contradictoires (Xiao et al. 2001 ; Petrishchev et al. 2001).
- c. Le rôle du stress oxydant dans le mécanisme du RIPC a été démontré par Weinbrenner et al. qui ont montré que l'utilisation des "scavengers" des radicaux libres inhibait la cardioprotection du RIPC. Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces radicaux libres sont générés par l'organe préconditionné ou par le myocarde (Weinbrenner et al. 2004).
- d. Les canaux K^+_{ATP} sarcolemmaux et mitochondriaux sont impliqués dans la prévention des lésions de reperfusion. Leur implication dans le mécanisme du RIPC n'est pas bien élucidé malgré la démonstration de l'inhibition de son effet cardioprotecteur suite à l'utilisation des antagonistes des canaux K^+_{ATP} tels que la glibenclamide ou le 5-hydroxydécanoate (Kristiansen et al. 2005 ; Pell et al. 1998). Reste aussi à déterminer si ce sont les canaux K^+_{ATP} au

niveau de l'organe préconditionné et/ou ceux au niveau du myocarde qui jouent un rôle dans le mécanisme du RIPC.

L'implication de la voie de signalisation RISK et du pore mPTP dans le mécanisme d'action du RIPC n'est pas encore démontrée. Une étude récente a démontré l'implication des voies MAPK, p38 et ERK1/2 (Heidbreder et al. 2008) mais le rôle de la voie PI3K/Akt reste à identifier.

2.3.3. Application clinique

Chez l'homme, l'effet cardioprotecteur du RIPC a été démontré pour la première fois dans une étude réalisée chez des enfants ayant une malformation cardiaque congénitale et qui étaient soumis à une circulation extracorporelle "*cardiopulmonary bypass*". RIPC était induit en appliquant quatre cycles de 5 minutes d'ischémie/5 minutes reperfusion au niveau d'un membre inférieur par un brassard à tension. Le RIPC a diminué les taux sériques de troponine I libérée après l'intervention et limité l'utilisation d'inotropes en postopératoire (Cheung et al. 2006). Une autre étude clinique a été réalisée chez des patients bénéficiant d'un pontage aorto-coronaire (CABG "*coronary-artery bypass surgery*"). Ces patients ont été randomisés après anesthésie dans un groupe RIPC (3 cycles de 5 minutes d'ischémie/5 minutes reperfusion ont été réalisés au niveau d'un membre supérieur par un brassard à tension) ou un groupe control. Les résultats ont montré une diminution du taux de la troponine-T sérique à 6, 12, 24 et 48 heures en post-chirurgie dans le groupe RIPC (Hausenloy et al. 2007). Ces résultats ont été confirmés sur ce même type de population avec une technique de cardioplégie plus habituelle que celle utilisées dans le premier travail (Venugopal et al. 2009). L'ensemble des essais cliniques publiés avec RIPC figure dans le tableau 1.

Récemment une étude clinique réalisée sur 142 patients ayant un syndrome coronarien aigu avec une élévation du segment ST, a démontré l'effet cardioprotecteur du RIPost. Le RIPost était induit en appliquant quatre cycles de 5 minutes d'ischémie/5 minutes reperfusion au niveau d'un membre supérieur par un brassard à tension lors du transport des patients à l'hôpital. Tous les patients avaient été reperfusés par une PCI. La taille de la zone à risque a été mesurée par le SPECT

"*single photon emission CT*". La taille d'infarctus a été mesurée 30 jours après PCI. Les résultats ont montré une diminution significative de la taille d'infarctus dans le groupe RIPost. Pour la première fois, ce travail soulève l'espoir d'une intervention non-invasive débutée avant l'hospitalisation et capable de réduire les lésions de reperfusion (Bøtker et al. 2010).

	Patient group	Stimulus	Outcomes	N
Cheung (2006)	Pediatric cardiac surgery	Upper-limb ischemia (4cycles of 5min)	Reduced troponin; reduced inotrope score; reduced airway resistance	37
Hausenloy (2007)	CABG	Upper-limb ischemia (3cycles of 5min)	Reduced troponin	57
Ali (2007)	AAA surgery	Lower-limb ischemia (2cycles of 10min)	Reduced troponin; reduced perioperative MI; preserved renal function	82
Hoole (2009)	Elective coronary angioplasty	Upper-limb ischemia (3cycles of 5min)	Reduced troponin; reduced MACCE	242
Venugopal (2009)	CABG (cold-blood cardioplegia)	Upper-limb ischemia (3cycles of 5min)	Reduced troponin	45
Botcker (2010)	Primary coronary angioplasty (STEMI)	Upper-limb ischemia (3cycles of 5min)	Increased myocardial salvage; decreased infarct size at 1 month	333

Tableau 1 : Les études cliniques démontrant un effet bénéfique du conditionnement à distance. N, nombre des patients; CABG, coronary-artery bypass surgery; AAA, abdominal aortic aneurysm; MI, myocardial infarction; MACCE, major adverse cardiac and cerebral event; STEMI, ST-elevation myocardial infarction (Kharbanda et al. 2009).

L'objectif de la troisième partie de cette thèse a été de tester l'implication de la voie RISK et de la GSK-3 β dans le mécanisme d'action du RIPost. En raison de son fort potentiel d'application clinique, nous avons comparé l'efficacité du RIPost et du IPost dans un même modèle expérimental.

III. La cardioprotection pharmacologique

Plusieurs agents pharmacologiques ont été reconnus pour leur effet cardioprotecteur contre les lésions de reperfusion (insuline (Liu et al. 2007), opioïdes (Chen et al. 2008), bradykinine (Yoshida et al. 2005), cyclosporine (Massoudy et al. 1997)...).

La cardioprotection induite par l'érythropoïétine (EPO) a été largement étudiée dans différents modèles expérimentaux depuis la découverte des récepteurs spécifiques à l'EPO au niveau des cardiomyocytes (Wright et al. 2004). C'est cette molécule spécifiquement qui a fait l'objet de nos recherches au laboratoire.

3.1. L'érythropoïétine

3.1.1. Description

L'EPO est une glycoprotéine endogène qui permet la régulation de la production des globules rouges. Chez l'être humain, l'EPO est produite par les cellules peritubulaires au niveau des reins des adultes, et dans les hépatocytes chez les fœtus. Une faible quantité d'EPO extra-rénale est produite par le foie chez les sujets adultes.

L'EPO se lie aux récepteurs qui existent à la surface des progéniteurs érythroïdes. La liaison EPO/récepteur conduit à une activation des voies de signalisation intracellulaire inhibant l'apoptose de ces cellules progénitrices et augmente ainsi la production de globules rouges. L'érythropoïèse est plus liée à

l'inhibition de l'apoptose des précurseurs érythroïdes qu'à la stimulation de leur prolifération (van der Meer et Lipsic. 2006).

L'EPO recombinante humaine (rhEPO) est utilisée pour traiter l'anémie chez les patients ayant une insuffisance rénale chronique, les sidéens ayant une anémie secondaire au traitement par la zidovudine et les patients ayant une hémopathie maligne non myéloïde traitée par une chimiothérapie (Fisher. 2003).

3.1.2. Les récepteurs à l'érythropoïétine

Le récepteur à l'EPO est un membre de la superfamille des récepteurs aux cytokines (Kaygisiz et al. 2006).

La récente découverte de récepteurs à l'EPO hors du système hématopoïétique (Nishiya et al. 2006), au niveau des cellules endothéliales (van der Meer et Lipsic. 2006 ; Kaygisiz et al. 2006), des trophoblastes (van der Meer et Lipsic. 2006), des cellules rénales (Kaygisiz et al. 2006), neuronales (Kaygisiz et al. 2006 ; Nishiya et al. 2006), musculaires lisses (Kaygisiz et al. 2006), de la rétine (Kaygisiz et al. 2006 ; Nishiya et al. 2006), a incité à la recherche des effets « non-hématopoïétiques » de l'EPO (van der Meer et Lipsic. 2006).

En 2003, la découverte de récepteurs à l'EPO au niveau des cardiomyocytes a ouvert des espoirs dans le domaine de la cardioprotection induite par l'EPO (Wright et al. 2004).

Les résultats de plusieurs travaux ont montré que l'EPO exerce sa propriété de protection tissulaire non pas par liaison à un récepteur homodimérique classique à l'EPO mais plutôt à un complexe de récepteur hétérodimérique qui contient comme sous-unité un récepteur à l'EPO (Moon et al. 2005). En effet, Brines et al. ont démontré que les effets protecteurs tissulaires de l'EPO peuvent être induits *via* un récepteur hétérodimère comprenant deux sous-unités, un récepteur à l'EPO et une sous-unité bêta (CD 131) impliquée dans l'expression des effets d'autres cytokines

(Brines et Cerami. 2006). Une variante non-érythropoïétique de l'EPO pourrait alors médier une protection tissulaire *via* cette sous-unité (Moon et al. 2006).

Le fait que les effets hématopoïétiques et cardioprotecteurs de l'EPO passent par l'activation des deux récepteurs distincts suggère que la cardioprotection induite par l'EPO est indépendante de son effet sur l'hématopoïèse. Cela a été aussi confirmé par de nombreuses études menées sur des cardiomyocytes isolés (Calvillo et al. 2003 ; Parsa et al. 2003 ; Tramontano et al. 2003 ; Burger et al. 2006). De plus, dans différents modèles expérimentaux la diminution de la taille d'infarctus induite par l'EPO n'était pas liée à une augmentation de la concentration des globules rouges (Moon et al. 2003 ; Parsa et al. 2003).

3.1.3. Effet cardioprotecteur de l'érythropoïétine

L'effet cardioprotecteur de l'EPO a été observé dans différents modèles expérimentaux, qu'elle soit administrée avant l'induction de l'ischémie (Cai et al. 2003 ; Bullard et Yellon. 2005), immédiatement avant (Parsa et al. 2003) ou après induction de l'ischémie (Moon et al. 2003), au moment de la reperfusion (Calvillo et al. 2003) et après la reperfusion (van der Meer et al. 2005 ; Prunier et al. 2007) :

- a. Administrée 24 heures avant l'induction de l'ischémie, l'EPO induit son effet cardioprotecteur dans un modèle d'IDM chez le rat, améliorant les paramètres hémodynamiques cardiaques et diminuant l'apoptose et la taille de la zone infarctée (Cai et al. 2003 ; Bullard et Yellon. 2005).
- b. Son administration au moment de l'induction de l'ischémie a montré les mêmes résultats dans un modèle d'IDM chez le rat (Moon et al. 2003) et le lapin (Parsa et al. 2003).
- c. De même ces résultats ont été aussi observés après une administration de l'EPO au moment de la reperfusion dans un modèle d'infarctus chez le rat *in vitro* (Bullard et al. 2005 ; Hanlon et al. 2005 ; Chan et al. 2007) ou *in vivo* (Bullard et al. 2005 ; Calvillo et al. 2003 ; Lipsic et al. 2004).
- d. De plus, l'effet cardioprotecteur de l'EPO a été aussi démontré suite à son

administration après la reperfusion dans différents modèles expérimentaux (van der Meer et al. 2005 ; Prunier et al. 2007 ; Moon et al. 2005 ; Hirata et al. 2006). À cet égard, les études faites sur l'effet retard de l'EPO ont suggérées deux hypothèses importantes ; a) une dose unique d'EPO administrée 24 heures après la reperfusion dans un modèle d'ischémie-reperfusion (Gao et al. 2007) peut entraîner une diminution de la taille d'infarctus, b) l'administration chronique d'EPO initiée après l'infarctus du myocarde peut moduler le remodelage et préserver les fonctions hémodynamiques du ventricule gauche (VG) à long terme, dans un modèle d'ischémie-reperfusion (Prunier et al. 2007).

3.1.4. Mécanisme de la cardioprotection induite par l'érythropoïétine

3.1.4.1. Inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes

Plusieurs études ont démontré l'effet anti-apoptotique de l'EPO sur des cardiomyocytes isolés (Calvillo et al. 2003 ; Parsa et al. 2003 ; Tramontano et al. 2003 ; Burger et al. 2006). Cet effet a été confirmé par d'autres études in vitro et in vivo (Parsa et al. 2004 ; Lipsic et al. 2004 ; Hirata et al. 2005).

De plus, il a été rapporté qu'une augmentation progressive du nombre des cellules apoptotiques avait lieu dans les 72 heures suivant la reperfusion (Zhao et al. 2001). Ce phénomène pourrait expliquer alors l'effet cardioprotecteur de l'EPO administré après la reperfusion (Moon et al. 2005).

3.1.4.2. Inhibition de l'inflammation

L'effet de l'EPO sur la réponse inflammatoire déclenchée après une ischémie-reperfusion a été identifié dans plusieurs études expérimentales (Liu et al. 2006 ; Rui et al. 2005). Malgré la démonstration de sa capacité à atténuer l'inflammation en

diminuant l'infiltration des neutrophiles et le taux des cytokines pro-inflammatoires, il n'est pas clair si son effet anti-inflammatoire contribue à la survie des cardiomyocytes ou si c'est la conséquence de la prévention du mort cellulaire. De plus, la cardioprotection induite par l'EPO indépendamment de son effet anti-inflammatoire a été démontré dans des modèles des cardiomyocytes isolés ou des cœurs isolés perfusés (Bullard et al. 2005 ; Hanlon et al. 2005).

3.1.4.3. Les voies de signalisation impliquées dans le mécanisme de l'érythropoïétine

La liaison de l'EPO sur son récepteur déclenche une cardioprotection suite à l'activation de plusieurs voies de signalisation (Figure 12).

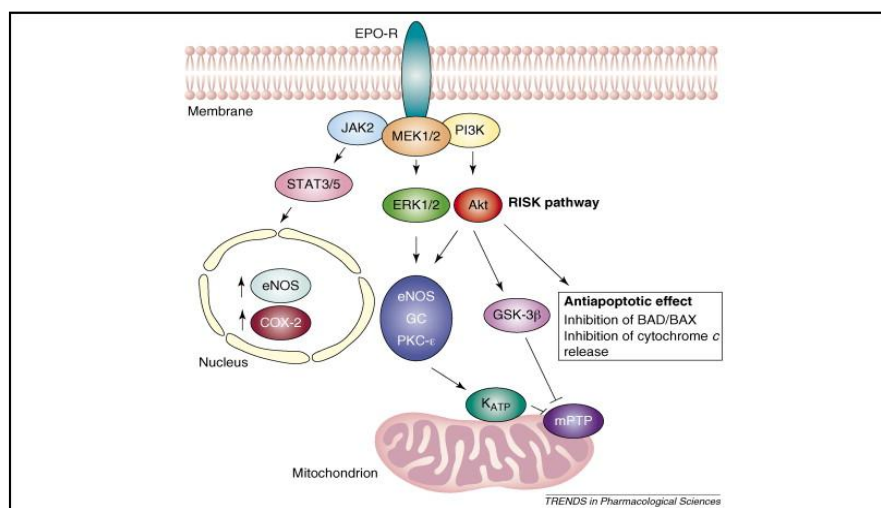


Figure 12 : Les voies de signalisation intracellulaires activées par l'EPO (Riksen et al. 2008).

3.1.4.4.1. La voie RISK

L'EPO administrée au moment de la reperfusion entraîne une activation de la voie RISK avec ces deux composantes : la voie PI3K/Akt et la voie ERK1/2. Bullard et al. ont démontré dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé que l'utilisation de la Wortmannin ou de la LY-294002 (inhibiteurs de la voie PI3K/Akt) inhibe l'effet cardioprotecteur de l'EPO administrée au moment de la reperfusion. De même,

l'utilisation de U-0126 (inhibiteur d'ERK1/2) dans ce même modèle a inhibé l'effet de l'EPO sur la limitation de la taille d'infarctus (Bullard et al. 2005). Cela a été aussi démontré dans une autre étude réalisée sur un modèle d'IDM in vivo chez le rat (Baker et al. 2007). Le rôle de la voie PI3K/Akt dans la cardioprotection induite par l'EPO a été aussi démontré dans un modèle d'IDM in vivo chez le chien (Hirata et al. 2005). Dans ce modèle l'administration de la Wortmannin a inhibé l'effet de l'EPO sur la réduction de la taille d'infarctus et sur la diminution de l'apoptose (Hirata et al. 2005).

L'implication d'ERK1/2 dans le mécanisme de la cardioprotection induite par l'EPO n'a pas été observée dans certaines études expérimentales. Hanlon et al. ont démontré dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé que l'inhibition d'ERK1/2 par U0126 n'entraîne pas une inhibition de l'effet cardioprotecteur de l'EPO administré au moment de la reperfusion. Des études faites sur des cardiomyocytes isolés ont démontré que l'EPO induit une phosphorylation rapide d'Akt et ERK1/2. L'inhibition de l'effet anti-apoptotique a été observée en inhibant la voie PI3K/Akt (Parsa et al. 2003; Tramontano et al. 2003) mais non pas la voie ERK1/2 (Parsa et al. 2003).

3.1.4.4.2. La voie JAK/STAT

Il a été démontré que l'administration de l'EPO au moment de la reperfusion entraîne une augmentation de la phosphorylation de la voie JAK-2/STAT-3 dans un modèle de lapin in vivo (Parsa et al. 2004). Les résultats de ces études ont suggéré l'implication de la JAK-2 dans le mécanisme de la cardioprotection induite par l'EPO et non pas la JAK-1. Dans cette étude une augmentation de la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2 a été aussi observée suite à l'administration d'EPO. Une augmentation significative de la JAK-2 a été observée dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé (Chan et al. 2007). L'EPO dans ce modèle a été injectée à la reperfusion. À côté de cette augmentation significative du JAK-2 ainsi que d'autres protéines kinases (ERK1/2), une réduction de la taille d'infarctus et une amélioration des fonctions hémodynamiques ont été observées suite à l'utilisation d'EPO dans ce modèle (Chan et al. 2007). Le rôle de la voie JAK/STAT dans le mécanisme d'EPO doit être

confirmé dans des modèles utilisant des inhibiteurs spécifiques de cette voie.

3.1.4.4.3. Autres voies

De plus, il a été démontré que l'administration d'EPO au moment de la reperfusion pouvait augmenter le taux d'eNOS (Bullard et Yellon. 2005), induire la translocation de la protéine kinase C isoforme epsilon (PKC ϵ) (Bullard et al. 2005), entraîner l'ouverture des canaux K⁺_{ATP} au niveau de la mitochondrie et du sarcolemme (Baker et al. 2007) ainsi que l'inhibition de l'ouverture du mPTP en inhibant la GSK-3 β (Nishihara et al. 2006).

3.1.5. Implication clinique

Les données sur l'effet cardioprotecteur de l'EPO chez l'homme sont jusqu'à présent limitées.

En 2002, une étude clinique a démontré pour la première fois que les lésions de reperfusion pouvaient être atténuées par un traitement à l'EPO chez des patients présentant une ischémie cérébrale. Cette étude présentait deux parties, une partie qui étudiait la sécurité de l'EPO (13 patients) et une autre testant son efficacité (40 patients, étude réalisée en double aveugle). La première partie a montré la sécurité d'emploi de l'EPO. Dans la deuxième partie, l'administration de l'EPO dans les 8 heures qui suivaient l'ischémie a été associée à une amélioration des paramètres fonctionnels et une diminution de la taille de l'infarctus cérébral observée par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) (Ehrenreich et al. 2002).

L'effet cardioprotecteur de l'EPO contre les lésions de reperfusion myocardique chez l'homme fait l'objet de plusieurs essais cliniques en cours.

IV. Lésions de reperfusion et dysrégulation du glucose

La principale cause de la cardiopathie ischémique est l'athérosclérose dont les principaux facteurs de risque sont : le tabac, l'hypertension (Ferdinandy et al. 2007), l'hyperlipidémie (Ferdinandy et al. 2007), le diabète (Matsui et Davidoff 2007), l'insulino-résistance (Matsui et Davidoff 2007), l'âge, les antécédents familiaux et la sédentarité.

La présence de ces facteurs est associée à des altérations moléculaires fondamentales qui peuvent potentiellement affecter le développement des lésions de reperfusion et la réponse aux interventions protectrices. Des études précliniques étudiant des stratégies de cardioprotection en présence d'une comorbidité sont alors fondamentales (Ferdinandy et al. 2007).

4.1. Infarctus du myocarde et diabète

On distingue deux grands types de diabètes:

- Le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant, dû à la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans. Cette pathologie est multifactorielle (facteurs environnementaux et héréditaires) et touche en France plus de 150000 patients.

- Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant correspond à un dysfonctionnement des cellules β des îlots de Langerhans et associé à une résistance ou une diminution de la sensibilité périphérique à l'insuline. Le plus important facteur de risque prédisposant à ce type de diabète est l'obésité.

Les études épidémiologiques et les essais cliniques ont clairement montré que les diabétiques de type 1 et 2 développent plus fréquemment des cardiopathies ischémiques. La cardiopathie associée au diabète est une cause majeure de morbidité et mortalité, et le taux de mortalité après un IDM ou une PCI est approximativement doublé chez les patients diabétiques (Abbott. 1988).

4.1.1. Modèles des rats diabétiques type 1

Les modèles animaux de diabète sont utilisés depuis des décennies. Ceux-ci peuvent être spontanés ou provoqués. Les modèles spontanés sont rares chez l'animal et le type de diabète n'est pas forcément semblable à celui trouvé chez l'homme. Cependant, certaines souches d'animaux diabétiques ont été créés dans ce but.

Les modèles de diabète de type 1 induis chez le rat sont obtenus par administration d'agents toxiques pour le pancréas tels que la streptozotocine (STZ) ou l'alloxane.

La STZ est un antibiotique anti-tumoral de synthèse, utilisée en chimiothérapie anticancéreuse. Ce médicament toxique pour le pancréas endocrine, est indiqué dans le traitement des adénocarcinomes métastatiques des îlots de Langerhans (Vidal. 2003). Cet agent a été largement utilisé dans plusieurs études expérimentales pour induire le diabète type 1 chez le rat (Gross et al. 2007 ; Tosaki et al. 1996 ; Kim et al. 2010).

L'alloxane, autre agent exerçant une activité cytotoxique sur les cellules β , peut aussi provoquer une destruction de ces cellules et induire le diabète type 1 chez le rat (Kersten et al. 2000 ; Kersten et al. 2001 ; Tanaka et al. 2002).

D'autres substances peuvent être utilisées chez l'animal pour induire le diabète type 1, mais leur utilisation en recherche est limitée. Il s'agit de la cyclophosphamide qui a une action limitée sur les animaux pré-diabétiques (Charlton et al. 1989) et la pentamidine caractérisée par un long délai d'action (Collins et al. 1989).

Étant donné la validité dans plusieurs études expérimentales du modèle de diabète type 1 induit chez le rat par administration de la STZ, nous avons choisis ce modèle pour réaliser nos expériences.

4.1.2. Diabète type 1 et stratégies cardioprotectrices

La réponse myocardique aux interventions cardioprotectrices nécessite l'activation de plusieurs voies de signalisation. Le diabète type 1 associe une hypoinsulinémie et une hyperglycémie pouvant altérer le bon fonctionnement de ces voies.

Tosaki et al. ont rapporté l'inhibition de l'effet cardioprotecteur du préconditionnement dans le modèle de diabète type 1 induit par l'administration de STZ (Tosaki et al. 1996). Ces résultats étaient similaires à ceux observés dans un modèle de diabète induit par une co-administration de STZ et d'alloxane (Kersten et al. 2000). D'autres études expérimentales ont démontré l'absence de l'effet de certains agents pharmacologiques cardioprotecteurs administrés au moment de la reperfusion (morphine (Gross et al. 2007), isoflurane (Tanaka et al. 2002), diazoxide (Kersten et al. 2001), remifentanyl (Kim et al. 2010)).

L'absence de la cardioprotection dans les cœurs diabétiques a été expliquée par l'altération des voies de signalisation cardioprotectrices (Figure 13).

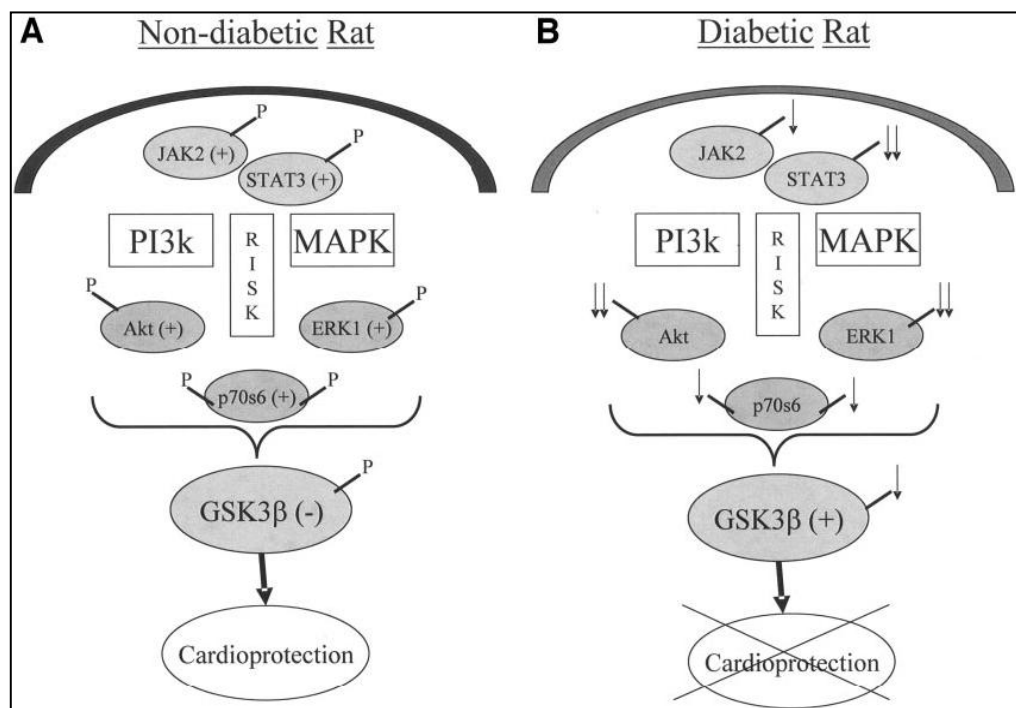


Figure 13 : Schématisation de l'altération des voies de signalisation cardioprotectrices en présence du diabète type 1 (Gross et al. 2007).

4.2. Infarctus du myocarde et insulino-résistance

L'insulino-résistance chez l'homme est souvent associée à une dyslipidémie, une hypertension et une obésité abdominale. C'est ce qu'on appelle le syndrome métabolique (Isomaa. 2003). Ce syndrome augmente d'un facteur 3 le risque de développer un IDM (Isomaa et al. 2001).

Le modèle d'insulino-résistance chez le rat peut être induit en soumettant le rat à un régime hypercalorique, avec un apport d'environ 35 % de matières grasses (Dumas et al. 2009).

Peu d'études expérimentales ont été faites pour explorer l'impact de l'insulino-résistance sur la réponse myocardique aux interventions cardioprotectrices. Une étude a démontré l'absence d'effet cardioprotecteur du IPost chez des rats ayant un syndrome métabolique (étude réalisée avec des rats WOKW "*Wistar-Ottawa-Karlsburg W*", génétiquement modifiés pour présenter un syndrome métabolique proche du syndrome humain). L'altération de la voie ERK1/2 et par conséquent l'inhibition de la phosphorylation de la GSK-3 β semble être la cause de l'absence de la cardioprotection dans ce modèle (Wagner et al. 2008).

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons testé l'effet cardioprotecteur de l'EPO utilisée au moment de la reperfusion, chez des rats ayant un diabète ou une insulino-résistance.

TRAVAUX ET RÉSULTATS

Chapitre II. Travaux et Résultats

Projet 1. Étude des lésions de reperfusion myocardique : L'érythropoïétine comparée au postconditionnement ischémique

1. Introduction

La cardioprotection induite par le IPost passe par l'activation de la voie RISK, constituée de la voie PI3K/Akt et la voie ERK1/2 (Tsang et al. 2004 ; Darling et al. 2005). L'effecteur en commun de ces deux voies de signalisation, la GSK-3 β , joue un rôle crucial dans le mécanisme du IPost (Gomez et al. 2008). Récemment, l'effet protecteur du IPost a été démontré dans une étude clinique (Staat et al. 2005) réalisée chez des patients ayant un infarctus aigu reperfusé par PCI. Cependant, l'application de cette intervention cardioprotectrice est limitée à la reperfusion faite par angioplastie. La recherche d'un agent pharmacologique mimant l'effet cardioprotecteur de IPost a donc un intérêt majeur.

Depuis la découverte des récepteurs à l'EPO au niveau des cardiomyocytes, plusieurs études expérimentales ont démontré son effet cardioprotecteur contre les lésions d'I/R (Bullard et al. 2005 ; Calvillo et al. 2003 ; Lipsic et al. 2004). L'implication de la voie RISK dans son mécanisme d'action a été clairement rapportée (Hanlon et al. 2005 ; Bullard et al. 2005).

L'objectif de ce travail était de comparer l'effet cardioprotecteur d'un IPost à celui de l'EPO, administrée au moment de la reperfusion, dans le même modèle expérimental. Leurs effets sur la récupération des paramètres hémodynamiques, la réduction de la taille d'infarctus, la diminution de l'apoptose, l'activation des principales voies de signalisation impliquées dans leur mécanisme d'action (la voie PI3K/Akt et la voie ERK1/2) et l'inhibition de la GSK-3 β ont été étudiés dans le modèle d'ischémie globale sur cœur isolé et dans un modèle d'I/R in vivo.

2. Matériels et méthodes

2.1. Technique du cœur isolé perfusé

2.1.1. Généralités

Le principe de la technique de Langendorff (1895) est d'assurer l'oxygène et les nutriments nécessaires à un cœur isolé, dans le but de mesurer un grand nombre de paramètres et avoir le maximum d'informations sur les conditions des myocardiocytes et des vaisseaux coronaires, à partir d'un seul cœur.

Dans les préparations classiques développées par Langendorff, le cœur est rapidement prélevé puis monté par l'aorte sur une canule permettant une perfusion rétrograde de l'organe (au contraire du sens du flux sanguin *in vivo*). La perfusion peut se faire à une pression constante ou à un débit constant, avec une solution saline oxygénée.

Le perfusé peut être du sang ou une solution physiologique. Il s'achemine donc aux artères coronaires puisque les valvules sigmoïdes aortiques l'empêchent de pénétrer dans le ventricule gauche. Pour un cœur de petite taille comme celui du rat, il convient donc de ne pas introduire la canule trop profondément dans l'aorte pour éviter l'oblitération de l'abouchement des artères coronaires.

Dans notre travail, le cœur a été perfusé en système ouvert (le perfusé ne passe qu'une seule fois à travers l'organe), à pression constante.

Nous avons utilisé comme perfusé la solution du Krebs-Henseleit modifiée, ayant la composition suivante : NaCl 118mM ; KCl 5,6mM ; MgCl₂ 1,2mM ; Na₂HPO₄ 1,2mM ; NaHCO₃ 20mM ; glucose 12 mM ; CaCl₂ 2,4mM.

Chacun de ces molécules a un rôle indispensable pour le fonctionnement du cœur:

- NaCl: Na⁺ joue un rôle majeur dans l'osmolarité et dans le maintien du potentiel d'action;
- KCl: K⁺ permet de maintenir la différence de potentiel de membrane en maintenant sa concentration intracellulaire;
- MgCl₂: Mg²⁺ est un cofacteur enzymatique important;

- NaHCO_3 et NaH_2PO_4 : tampon acido-basique pour avoir un pH final de 7,4;
- glucose: source d'énergie disponible pour les cellules;
- CaCl_2 : Ca^{2+} est indispensable pour la contraction musculaire et un cofacteur enzymatique important.

Ce liquide est saturé par du carbogène (mélange de 95% O_2 et 5% CO_2) permettant de maintenir un apport constant en oxygène aux myocytes et de maintenir le pH de la solution au voisinage de 7,4 grâce aux systèmes tampons $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{HPO}_4$. Avant utilisation, ce liquide est filtré sous vide sur filtre millipore (Gelman Laboratory, GH Polypro, 0,45 μm), afin d'éviter toute obstruction possible du réseau coronaire par des particules contaminants.

2.1.2. Prélèvement du cœur

Des rats Wistar femelles âgés de 10 semaines (~200-250g) ont été utilisés pour réaliser ces expériences. Les rats ont été anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (Penthotal®; Ceva Santé Animal Solution injectable, 100 mg/kg de masse corporelle). L'animal a été placé en décubitus dorsal sur une planchette à contention en polystyrène. Une injection d'héparine (Héparine Choay® solution injectable en flacon IV Sanofi-Aventis, 1500 UI/kg de masse corporelle) a été pratiquée dans la veine fémorale afin d'éviter toute formation de caillots sanguins risquant d'obstruer les vaisseaux coronaires au moment du prélèvement du cœur.

Après section du diaphragme, la cage thoracique a été excisée bilatéralement et le cœur a été rapidement prélevé par section de toutes les adhérences et de la crosse aortique juste en avant du tronc brachio-céphalique. L'artère pulmonaire ainsi que l'oreillette droite ont été incisées pour faciliter un drainage coronaire complet dans les ventricules. Les veines pulmonaires ont été disséquées sur la face latérale de l'oreillette gauche permettant de dégager un orifice suffisamment large pour l'introduction du ballonnet de pression dans le ventricule gauche.

Le cœur a été aussitôt immergé dans du liquide physiologique de type Krebs-Henseleit refroidi (environ 4°C) pour éviter les lésions ischémiques. Cette

hypothermie entraînait un arrêt quasi-immédiat des contractions cardiaques réduisant ainsi les dépenses énergétiques et facilitant le montage du cœur sur une canule de perfusion.

2.1.3. Perfusion du cœur

Après prélèvement le cœur a été branché rapidement à l'appareil de perfusion (EMKA TECHNOLOGIES, France). Une canule spécifique était reliée au système dans son enceinte close, la chambre thermostatée. Le perfusé a été mis en circulation dans l'appareil avant d'accrocher le cœur, cela permettait la prévention des embolies d'air qui peuvent avoir lieu au moment de la canulation. Après ligature de l'aorte sur la canule, le cœur a été perfusé de façon rétrograde selon la méthode de Langendorff avec le liquide physiologique de type Krebs-Henseleit modifié, ayant une température de 37°C. À ce stade l'oreillette gauche a été délicatement retirée et un ballonnet en latex (VK32-0-00017 Latex ballon size 3: 0,03 ml) connecté au capteur de pression a été introduit dans le ventricule gauche. Une seringue Hamilton connectée au ballonnet nous permettait de régler la pression télédiastolique entre 8 et 10 mmHg.

2.1.4. Protocole expérimental

Tous les cœurs isolés ont été soumis à une période de 20 minutes de stabilisation suivie de 25 minutes d'ischémie globale. L'ischémie était induite en arrêtant la perfusion. Les cœurs qui avaient une pression développée ventriculaire gauche en stabilisation inférieure à 70 mmHg malgré une pression télédiastolique à 10 mmHg ont été exclus de l'étude. Les cœurs inclus ont été ensuite randomisés au hasard dans l'un des groupes suivants :

- 1) Groupe contrôle, dans ce groupe la reperfusion a eu lieu sans aucune intervention.
- 2) Groupe IPost, dans lequel trois cycles de 10 sec d'ischémie suivis de 10 sec de reperfusion ont été appliqués au moment de la reperfusion.
- 3) Groupe EPO, une dose de 1000 UI de darbepoietin alpha (Aranesp[®], Amgen)/kg de poids corporel du rat a été injectée au moment de la reperfusion, au niveau de la canule qui maintient l'aorte.

- 4) Groupe IPost + un inhibiteur spécifique de la voie PI3K/Akt, la wortmannin (1 $\mu\text{mol/l}$, Sigma), ajouté au perfusat au moment de la reperfusion.
- 5) Groupe EPO + Wort.
- 6) Groupe IPost + un inhibiteur spécifique de la voie ERK1/2, le PD-98059 (10 $\mu\text{mol/l}$, Sigma), ajouté au perfusat au moment de la reperfusion.
- 7) Groupe EPO + PD-98059.

Six cœurs de chacun de ces groupes ont été perfusés pendant 30 minutes avant de prendre le VG, le congeler dans l'azote liquide et le conserver à -80°C pour l'utiliser dans l'analyse des voies de signalisation par Western Blot.

Cinq autres cœurs des groupes contrôle, IPost et EPO ont été perfusés pendant 2 heures avant de prendre le VG, le découper transversalement en 5 à 6 tranches d'1 mm d'épaisseur et l'utiliser pour mesurer la taille d'infarctus après marquage triphényltétrazolium chloride (TTC).

2.2. Mesure des paramètres hémodynamiques

Les enregistrements des paramètres hémodynamiques ont été faits sur un ordinateur par le logiciel IOX 1,593. Les paramètres ont été monitorés tout au long de l'expérience et analysés en fin de stabilisation, et à 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes de la reperfusion.

Les paramètres suivants ont été analysés:

- Psys (mmHg): Pression VG systolique maximale;
- Pdias (mmHg): Pression VG diastolique minimale;
- PD (mmHg): Pression développée (Psys-Pdias);
- PTDVG (mmHg): Pression télédiastolique ventriculaire gauche;
- $+dP/dt$ max (mmHg/sec) : pic positif de dérivée première de la pression du VG en systole;
- $-dP/dt$ min (mmHg/sec) : pic négatif de dérivée première de la pression du VG en diastole.

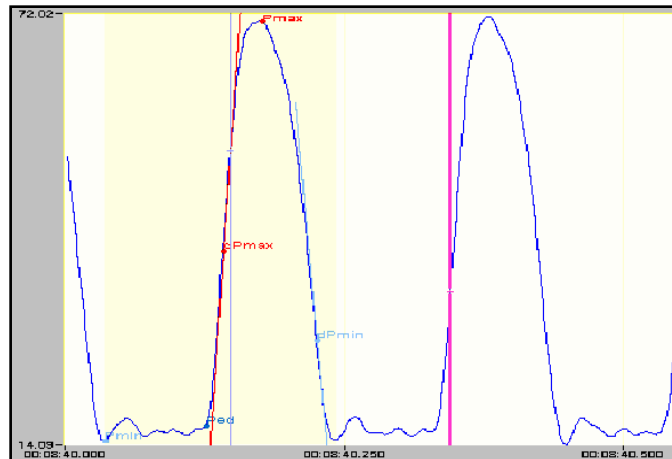


Figure 14 : Schématisation de la pression systolique maximale du ventricule gauche (Pmax), la pression diastolique minimale du ventricule gauche (Pmin), la pression télédiastolique (Ped), +dP/dt max (dPmax) et -dP/dt min (dPmin). Axe des y: pression (mmHg) et axe des x: temps (min).

2.3. Technique biochimique : la technique de Western Blot

2.3.1. Extraction et dosage des protéines

À la fin des 30 minutes de reperfusion des cœurs isolés perfusés, les ventricules gauches ont été collectés et conservés dans de l'azote liquide à -80°C . Pour l'extraction des protéines, les VG ont été broyés dans un mortier rempli d'azote liquide afin de les rendre à l'état de poudre. Ces broyats (200mg environ) ont été ensuite mis dans des tubes en présence de 500 μl de tampon de lyse (composition : Tableau 2). Les solutions de poudre ont été ensuite homogénéisées par un broyage mécanique puis centrifugé pendant une heure à 4°C . La solution de surnageant constituait alors les échantillons de protéines. D'autre part, une gamme étalon d'une concentration en protéines allant de 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ à 1 mg/ml , a été établie à partir d'une solution de sérum d'albumine bovine.

Tampon de lyse	QSP H₂O 100 ml
Hepes	0,715 g
EGTA	0,117 g
EDTA	0,073 g
KCl	0,15 g
Na ₃ VO ₄	0,864 g
NaF	0,168 g
NaPPi	0,1784 g
Glycerol	10 ml
Nonidet P40	0,1 ml
Inhibiteur de phosphatase	1%
Inhibiteur de protéase	1%

Tableau 2 : Composition du tampon de lyse.

2.3.2. Western Blot

C'est une technique qui sert à identifier les protéines selon leurs poids moléculaires, en se basant sur le principe de l'électrophorèse. L'électrophorèse est la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique, ceci se faisant au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS). On parle alors de SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Ensuite ce gel a été mis en contact avec une membrane de nitrocellulose et, un courant allant du gel vers la membrane permettait de fixer les protéines contenues dans le gel sur cette membrane. La membrane a été incubée avec un anticorps primaire capable de reconnaître la protéine recherchée et de la fixer, puis un anticorps secondaire marqué à la peroxydase a été ajouté au milieu afin qu'il puisse se fixer sur le premier anticorps. La membrane a été alors incubée avec du luminol qui est dégradée par la peroxydase et libère de l'énergie lumineuse capable

d'impressionner un film photographique hypersensible. Les protéines apparaissaient alors sous la forme de bandes sombres sur le film.

En détail cette technique comporte les différentes étapes suivantes :

a. Préparation des échantillons

Un volume correspondant à une masse de 40µg de protéines est pris des échantillons issus de l'extraction protéique. Un volume constant de tampon de charge "*loading buffer*" est ajouté (1/6 du volume final choisi en fonction de la capacité des puits du gel de migration). Tous les échantillons sont ensuite amenés à un volume identique en ajoutant de l'eau distillée. Pour dénaturer les protéines, les échantillons sont placés 5 minutes à 100°C. Ceci entraîne la suppression des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines permettant ainsi une fixation du tampon de charge sur ces protéines et donc de les charger négativement (transformation en anions). La migration électrophorétique ne se fait donc plus qu'en fonction de la masse moléculaire de chaque protéine, étant donné que chacune possède maintenant la même charge. Ensuite les échantillons sont transférés dans de la glace afin de stopper la réaction.

b. L'électrophorèse

Cette étape consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide à 10% "*running gel*". Ce gel de migration est composé de deux types de gel superposés ; le gel de séparation (Acrylamide 30% ; H₂O ; Tris HCl 1,5M pH 8,8 ; APS ; Temed) et le gel de concentration (Acrylamide 30% ; H₂O ; Tris HCl 0,5M pH 6,8 ; APS ; Temed). Une fois polymérisé, ce gel est placé dans la cuve d'électrophorèse en présence de tampon de migration "*running Buffer*" (Tris Base 3,03 g ; glycine 14,4 g ; SDS 20% 5 ml ; QSP 1000 ml H₂O). Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits du gel selon un ordre précis. Pour identifier la taille des protéines il est indispensable d'utiliser le marqueur de poids moléculaire que l'on dépose dans le premier puits. Le gel est ensuite soumis à un courant de 85 Volts pendant 10 minutes afin de le stabiliser puis à 110 Volts pendant environ une heure et demie pour faire migrer les protéines.

c. Le transfert

C'est l'étape qui permet le transfert des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose. Un courant électrique passant du gel vers la membrane permet ce transfert de protéines en présence d'un tampon de transfert (Tris Base 3,03 g ; glycine 14,4 g ; H₂O 800 ml ; méthanol 200 ml). Le méthanol contenu dans la solution du transfert active le gel en libérant les protéines de leur liaison au SDS et augmente leur liaison à la membrane.

d. Saturation de la membrane

La membrane de nitrocellulose possède plusieurs sites de fixation, donc il est important de bloquer tous les sites de liaison non spécifiques avant d'exposer la membrane à un ligand précis. Cela va permettre la saturation de la membrane et par la suite une meilleure spécificité de la liaison anticorps/protéines à quantifier. Pour cela la membrane est mise dans 10 ml de lait (0,5g de lait +10ml de TBS Tween) pendant une durée d'une heure. Les protéines du lait vont se lier à la membrane dans tous les sites non-occupés de la protéine cible, ainsi les anticorps ne peuvent que s'attacher sur les sites des protéines cibles.

e. Incubation avec les anticorps

Après avoir éliminé le tampon de blocage par rinçage à trois reprises avec du TBS, la membrane est prête pour son incubation dans un ligand spécifique de la protéine à détecter. Cette protéine joue le rôle d'un antigène qui se lie à un anticorps spécifique, l'anticorps primaire. L'incubation se fait à 4°C pendant toute une nuit. Le complexe protéine/anticorps primaire est alors formé. Pour le détecter un anticorps secondaire a été utilisé, qui n'est pas spécifique mais qui possède la capacité de se lier à l'anticorps primaire et donc de connaître une classe spécifique d'immunoglobuline (souvent IgG) de l'espèce animale source de l'anticorps primaire.

f. Révélation

La membrane est recouverte par du luminol que l'on laisse agir une minute dans le noir. La membrane est ensuite placée dans la chambre UV et révélée à l'aide du logiciel (Image LAS 3000) (la révélation a été réalisée dans le laboratoire INSERM U771; CNRS UMR 6214, Université d'Angers).

Dans le cas où plusieurs protéines doivent être détectées sur une même membrane, celle-ci peut être réutilisée après un décrochage des anticorps primaires et secondaires. Le décrochage des anticorps se fait en utilisant un tampon spécifique, le "*stripping buffer*" (SDS 20 % 10 ml ; Tris HCl 0,5 M pH 6,8 12,5 ml ; β -mercaptoéthanol 12,5 ml ; QSP 100 ml H₂O). Après rinçage de ce tampon la membrane a besoin d'être bloquée de nouveau avec du lait avant de procéder à l'incubation dans un autre anticorps primaire spécifique d'une autre protéine.

2.4. Mesure de la taille d'infarctus par le marquage triphényltétrazolium chloride

La mesure de la taille d'infarctus a été faite par la technique du marquage Triphényltétrazolium chloride "*TTC staining*".

En principe, le marquage TTC se base sur la capacité des enzymes déshydrogénases et des cofacteurs tissulaires à réagir avec le sel de tétrazolium, extrait des pigments de formazan. Cette libération tissulaire a lieu suite à la mort cellulaire. Cependant, un marquage positif n'est pas forcément un indicateur de la viabilité des tissus, dans certains cas le tissu peut être destiné à mourir dans les quelques heures suivantes. Pour cela plus est longue la période de reperfusion après une lésion ischémique, plus les résultats de cette méthode sont fiables.

Dans nos expériences les cœurs des rats ont été reperfusés pendant 2 heures avant de réaliser ce marquage. À la fin de la reperfusion les cœurs ont été collectés, le VG a été séparé du ventricule droit et des oreillettes. Cinq à six coupes ventriculaires gauches d'1 mm d'épaisseur ont été réalisées de l'apex à la base. Chaque coupe a ensuite été incubée pendant 20 minutes à 37°C dans une solution de TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride ; Sigma-Aldrich) dilué à 1% dans un tampon phosphate pH=7,4. Les faces apicales et basales de chacune des coupes ont été photographiées à l'aide d'un microscope optique (Leica DMS). La taille d'infarctus a été mesurée avec un logiciel de planimétrie (Image J) permettant de délimiter l'aire du VG (l'aire externe de la coupe en totale moins l'air interne) et l'aire de nécrose (blanche). La taille d'infarctus a été ensuite exprimée en pourcentage de l'aire totale du VG.

Modèle d'IM chez le rat in vivo

Les expérimentations ont été menées en accord avec le comité régional d'éthique en expérimentation animale (CREEA) des Pays de la Loire, sur un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez des rats Wistar femelles âgées de 7 à 8 semaines (200 à 250 g). Ce modèle est détaillé dans le projet 3.

2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel Sigma Stat version 3.5. Les différences entre les groupes ont été évaluées par un test ANOVA suivi d'un test Student-Newman-Keuls post hoc. Pour les paramètres hémodynamiques mesurés dans le modèle de cœur isolé perfusé un test ANOVA pour mesure répétées a été réalisé. Le seuil de significativité a été fixé pour $p < 0,05$.

3. Résultats

Les résultats de ce projet ont fait l'objet d'une publication: **Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H2035-H2043. Facteur d'impact 2009: 3.712.

Sophie Tamareille, Nehmat Ghaboura, Frederic Treguer, Dalia Khachman, Anne Croué, Daniel Henrion, Alain Furber and Fabrice Prunier
Am J Physiol Heart Circ Physiol 297:2035-2043, 2009. First published Jul 17, 2009;
doi:10.1152/ajpheart.00472.2009

You might find this additional information useful...

Supplemental material for this article can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/00472.2009/DC1>

This article cites 48 articles, 27 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/297/6/H2035#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/297/6/H2035>

Additional material and information about *AJP - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of December 2, 2009 .

Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning

Sophie Tamareille,^{1*} Nehmat Ghaboura,^{1*} Frederic Treguer,^{1,2} Dalia Khachman,¹ Anne Croué,³ Daniel Henrion,⁴ Alain Furber,^{1,2} and Fabrice Prunier^{1,2}

¹Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur Equipe d'Accueil 3860, Protection et Remodelage du Myocarde, Faculté de Médecine d'Angers, Université d'Angers, ²Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, ³Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, and ⁴Faculté de Médecine d'Angers, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6214, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U771, Université d'Angers, Angers, France

Submitted 20 May 2009; accepted in final form 15 July 2009

Tamareille S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2035–H2043, 2009. First published July 17, 2009; doi:10.1152/ajpheart.00472.2009.—Ischemic postconditioning (IPost) and erythropoietin (EPO) have been shown to attenuate myocardial reperfusion injury using similar signaling pathways. The aim of this study was to examine whether EPO is as effective as IPost in decreasing postischemic myocardial injury in both Langendorff-isolated-heart and in vivo ischemia-reperfusion rat models. Rat hearts were subjected to 25 min ischemia, followed by 30 min or 2 h of reperfusion in the isolated-heart study. Rats underwent 45 min ischemia, followed by 24 h of reperfusion in the in vivo study. In both studies, the control group ($n = 12$; ischemia-reperfusion only) was compared with IPost ($n = 16$; 3 cycles of 10 s reperfusion/10 s ischemia) and EPO ($n = 12$; 1,000 IU/kg) at the onset of reperfusion. The following resulted. First, in the isolated hearts, IPost or EPO significantly improved postischemic recovery of left ventricular developed pressure. EPO induced better left ventricular developed pressure than IPost at 30 min of reperfusion (73.18 ± 10.23 vs. 48.11 ± 7.92 mmHg, $P < 0.05$). After 2 h of reperfusion, the infarct size was significantly lower in EPO-treated hearts compared with IPost and control hearts ($14.36 \pm 0.60\%$, $19.11 \pm 0.84\%$, and $36.21 \pm 4.20\%$ of the left ventricle, respectively; $P < 0.05$). GSK-3 β phosphorylation, at 30 min of reperfusion, was significantly higher with EPO compared with IPost hearts. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK1/2 inhibitors abolished both EPO- and IPost-mediated cardioprotection. Second, in vivo, IPost and EPO induced an infarct size reduction compared with control ($40.5 \pm 3.6\%$ and $28.9 \pm 3.1\%$, respectively, vs. $53.7 \pm 4.3\%$ of the area at risk; $P < 0.05$). Again, EPO decreased significantly more infarct size and transmural extent than IPost ($P < 0.05$). In conclusion, with the use of our protocols, EPO showed better protective effects than IPost against reperfusion injury through higher phosphorylation of GSK-3 β .

ischemia; myocardial infarction; cardioprotection

CORONARY HEART DISEASE remains the leading cause of morbidity and mortality in Western countries. Prompt reperfusion of the ischemic myocardium is critical for salvaging the heart (5, 7, 35). However, a restoration of blood flow can paradoxically have deleterious consequences and lead to lethal myocardial ischemia-reperfusion injury (35). During the last two decades,

numerous strategies have been used in an attempt to reduce infarct size and improve ventricular function (46). However, none has shown a consistent clinical benefit. Therefore, new cardioprotective strategies, aimed at limiting myocardial infarct size, are required to attenuate reperfusion injury and to improve clinical outcomes. Ischemic postconditioning (IPost), defined as brief intermittent episodes of ischemia and reperfusion performed at the onset of reperfusion after a prolonged period of ischemia, offers a novel approach to myocardial protection (48). IPost has been shown to exert its cardioprotective effect by upregulating prosurvival kinases named the reperfusion injury salvage kinase (RISK), consisting of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), at the time of reperfusion (14, 39, 44). Although IPost is clinically applicable and has been successful in attenuating infarct size (42), its use as a clinical cardioprotective strategy to decrease ischemia-reperfusion injury is limited to patients with ongoing acute myocardial infarction subjected to coronary angioplasty. Therefore, the pharmacological activation of the RISK pathway at the time of myocardial reperfusion by administering specific pharmacological agents may provide a more amenable approach to cardioprotection. The hematopoietic cytokine erythropoietin (EPO), known to be an effective agent to treat renal anemia, has recently been shown to have a cardioprotective action against ischemia-reperfusion injury beyond its hematopoietic action (20). The presence of EPO receptors has been reported in cardiomyocytes (45), and the administration of EPO at the time of myocardial reperfusion has been shown to reduce ventricular dysfunction and apoptosis in a number of experimental studies (2, 3, 34). PI3K-Akt-GSK-3 β signaling plays a crucial role in protection by EPO against myocardial necrosis and apoptosis (11, 13, 23–26, 28, 30, 36, 43). However, despite a growing body of evidence indicating the cardioprotective effect of both IPost and EPO, no studies to date have ever compared both cardioprotective strategies in the same experimental model. The present study was designed to examine whether EPO is as effective as IPost to decrease postischemic myocardial injury in both Langendorff-isolated-heart and in vivo myocardial ischemia-reperfusion rat models.

MATERIALS AND METHODS

Female Wistar rats, 10 wk old and weighting ~ 200 – 250 g, were used in this study. All animals were treated in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, Revised

* S. Tamareille and N. Ghaboura contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: F. Prunier, Protection et Remodelage du Myocarde, UPRES EA 3860, Faculté de Médecine, Rue Haute de Reculée, FR-49045 Angers Cedex 1, France (e-mail: faprunier@chu-angers.fr).

1996). The protocol was approved by our regional Animal Care and Use Committee.

Study 1: Langendorff-Isolated Heart

Heart preparation. Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (100 mg/kg). Heparin (1,500 IU/kg) was administered intravenously to prevent intracoronary clot formation. The heart was rapidly excised and immediately immersed in ice-cold heparinized-modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mmol/l) 118 NaCl, 5.6 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 Na₂HPO₄, 20 NaHCO₃, 12 glucose, and 2.4 CaCl₂ (pH 7.4) (37). The heart was mounted on a Langendorff-perfusion apparatus (EMKA Technologies, Paris, France) and retrogradely perfused through the aorta with nonrecirculating buffer saturated with 95% O₂-5% CO₂ at 37°C. The heart was maintained in a thermostatic chamber at 37°C. Perfusion was maintained at a constant pressure of 75 mmHg. A fluid-filled latex balloon was inserted in the left ventricle (LV) via the left atrium for pressure recording. The balloon was connected to a pressure transducer (EMKA Technologies) and inflated to an initial LV end-diastolic pressure between 8 and 10 mmHg.

Isolated heart experimental protocol. All hearts were allowed to stabilize for 20 min. Hearts failing to develop LV systolic pressure over 70 mmHg when the end-diastolic pressure was set at about 10 mmHg were excluded. After the stabilization period, hearts underwent 25 min global ischemia and 30 min reperfusion (37) for hemodynamic study. Hearts were randomly assigned to one of following groups: 1) control (no intervention, $n = 12$); 2) postconditioning, i.e., three cycles of 10 s of full reperfusion followed by 10 s of global ischemia initiated immediately at the onset of reperfusion (IPost, $n = 16$) (22); 3) EPO, a single dose of darbepoetin alfa (1,000 IU/kg donor body wt), directly administered to isolated hearts at the onset of reperfusion (EPO, $n = 12$) (17); 4) IPost + wortmannin (1 μ mol/l, initiated at the onset of reperfusion and continued throughout the reperfusion period, $n = 10$); 5) EPO + wortmannin (initiated at the onset of reperfusion and continued throughout reperfusion, $n = 10$); 6) IPost + PD-98059 (10 μ mol/l, initiated at the onset of reperfusion and continued throughout the reperfusion period, $n = 11$); and 7) EPO + PD-98059 (initiated at the onset of reperfusion and continued throughout reperfusion, $n = 8$). In a subset of experiments, reperfusion was maintained for 120 min to evaluate infarct size (38).

Hemodynamic parameters assessment. The following parameters of cardiac function were continuously monitored and simultaneously recorded by IOX 1.593 software (EMKA Technologies): coronary flow (CF) rate, heart rate, LV systolic pressure, LV end-diastolic pressure, and the maximal (dp/dt_{max}) and minimal (dp/dt_{min}) value of the first derivative of LV pressure. LV developed pressure (LVDP) was calculated as the difference between the systolic and diastolic pressure of the LV.

Infarct size measurement. Infarct size was determined as previously described in five consecutive randomly selected rats from each group: control, IPost, and EPO (33). After 2 h of reperfusion, the hearts were harvested and the LVs were sectioned from apex to base into five to six 1-mm sections by using a coronal heart slicer matrix (Braintree Scientific). Sections were incubated in 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) in phosphate-buffered solution (pH 7.4) at 37°C for 20 min and then fixed in 10% formalin. For each section, the area of necrosis was quantified by planimetry using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD) and expressed as a percentage of the total LV area.

Western blot analysis. For analysis of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β phosphorylation, hearts were collected at the end of the 30 min reperfusion period and the LV was freeze clamped in liquid nitrogen (between stainless steel tongues precooled with liquid nitrogen) before being stored at -80°C. Frozen myocardial tissue samples were powdered in a mortar and pestle precooled to the temperature of liquid nitrogen. Approximately 200 mg of powdered ventricular tissue were

used for protein extraction. Frozen myocardial tissue samples were homogenized on ice in 1 ml ice-cold lysis buffer containing 30 mM HEPES, 20 mM KCl, 2.5 mM EGTA, 2.5 mM EDTA, 40 mM sodium fluoride, 4 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10% glycerol, and 1% Nonidet P-40, a phosphatase inhibitor cocktail (Sigma), and protease inhibitor cocktail (Complete mini, Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The homogenate was centrifuged at 13 000 rpm at 4°C for 30 min, and the resulting supernatant was collected. Protein concentration was determined using Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of the supernatant containing equal amounts of proteins (40 μ g) were heated to 95°C for 5 min in sample loading buffer. Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience). After the nonspecific binding sites with 5% nonfat milk for 1 h were blocked in Tris-buffered saline Tween (TBST) containing 20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl (pH 7.6), and 0.1% Tween-20, the membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit antibodies against ⁴⁷³Ser-phospho-Akt, total Akt, phospho-ERK1/2, total ERK1/2, ⁹Ser-phospho-GSK-3 β , and total GSK-3 β (1/1,000, Cell Signaling). After being washed in TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1/2,000, Santa Cruz Biotechnologies) and washed, and bound antibody was detected using an enhanced chemiluminescence Western blotting kit (Santa Cruz Biotechnologies). The densities of the bands with appropriated molecular mass (60 kDa for Akt, 42/44 for ERK1/2, and 46 for GSK-3 β) were determined semiquantitatively using a lumino-image analyser, LAS-3000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Study 2: In Vivo Ischemia-Reperfusion

Myocardial infarction model. Rats were anesthetized with 60 mg/kg pentobarbital sodium intraperitoneally and ventilated with an endotracheal tube (Series small animal ventilator, SAR-830/P, CWE). Body core temperature was monitored during the surgical procedure with a rectal thermometer and maintained at 36–38°C using a homeothermic blanket linked to a temperature control unit (HB101/2 RS, BIOSEB France). Animal transmitters (CTA-F40 implant, DSI, St. Paul, MN) were subcutaneously implanted for ECG monitoring. A left thoracotomy was performed in the fifth intercostal space. After the pericardium was removed to expose the heart, a 7-0 monofilament suture was placed around the proximal portion of the left anterior descending coronary artery (LAD). The ligature ends were passed through a small length of plastic tube to form a snare. For coronary artery occlusion, the snare was pressed onto the surface of the heart directly above the coronary artery. Ischemia was confirmed by blanching of the myocardium, dyskinesia of the ischemic region, and ST-segment elevation on the ECG. After 45 min of occlusion, reperfusion was achieved by loosening the snare and then confirmed by a marked hyperemic response at reperfusion.

In vivo experimental protocol. Rats were randomly assigned to four groups: 1) control (ischemia-reperfusion only); 2) sham-operated group (same procedure without tightening the snare); 3) postconditioning, i.e., 3 cycles of 10 s of reperfusion and 10 s of ischemia performed immediately after reperfusion, as described previously (IPost) (18, 19, 47); and 4) EPO, a single bolus of darbepoetin alfa (1,000 IU/kg), administered intravenously at the onset of reperfusion (EPO) (1, 15, 29). The rats were weaned from mechanical ventilation and returned to their cages to recover.

Infarct size assessment. Twenty-four hours after reperfusion, the rats were reanesthetized (100 mg/kg pentobarbital sodium ip). Heparin (1,500 IU/kg) was administered intravenously to prevent intracoronary clot formation. The heart was then removed, and the LAD was reoccluded using the 7-0 monofilament suture kept in place. The ascending aorta was retrogradely perfused ex vivo with Evans blue. The LV was sliced transversely from apex to base into five to six

1-mm slices. The slices were incubated in TTC as described above in *Study 1: Langendorff-Isolated Heart*. Computerized planimetry was used to determine the area at risk (AAR, nonblue) and the area of necrosis (white area). The percentage of myocardial infarction was calculated as the total infarcted area unstained by TTC divided by the total AAR for the heart.

Evaluation of apoptosis. The detection of apoptotic cells in five hearts from each group was carried out using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. After infarct size assessment, LV tissues from the AAR and from the remote myocardium were fixed in formalin for 24 h and embedded in paraffin, and 5- μ m sections were obtained. The sections were then deparaffinized and rehydrated with xylene and graded alcohol series. The sections were stained using the in situ DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Briefly, tissue sections were washed in PBS and then fixed in 4% paraformaldehyde solution before incubation in 20 μ g/ml proteinase K for 10 min. Sections were washed in PBS and were incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme in a humidified chamber at 37°C for 60 min for incorporation of biotinylated nucleotides at the 3'-OH DNA ends. The reaction was terminated by transferring the slides to 2 \times saline sodium citrate. Endogenous peroxidase activity was quenched by an incubation in 0.3% hydrogen peroxide. Finally, streptavidin horseradish peroxidase was bound to the biotinylated nucleotides, and peroxidase activity in each section was demonstrated by the application of a stable chromogen diaminobenzidine. With the use of this procedure, apoptotic nuclei are stained dark brown. The sections were counterstained with hematoxylin for total nuclei. Staining was viewed with an Olympus BX40 microscope and was analyzed. Three sections from each myocardial sample were randomly selected, and 10 microscopic fields per section were evaluated by two independent blind observers. In each field, the nuclei were counted and the percentage of TUNEL-positive nuclei was calculated.

Drugs

Darbepoetin alfa (Aranesp) was provided from Amgen. A darbepoetin alfa dose of 1,000 IU/kg donor body wt is approximately equivalent to 5 μ g/kg [Amgen (33)]. Pentobarbital sodium was obtained from Ceva Santé Animal and heparin (Heparin Choay) from Sanofi-Aventis. Wortmannin and PD-98059 were purchased from Sigma. Wortmannin and PD-98059 were dissolved in DMSO and diluted into buffer such that the vehicle constituted <0.02% of the total volume.

Statistical Analysis

All values are expressed as means \pm SE. Statistical analyses were performed by using Sigma Stat software version 3.5 (Systat software). Differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls post hoc test. For the Langendorff data, ANOVA for repeated measurements was used. A *P* value < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

EPO is Better than IPost in Preventing Postischemic Cardiac Injury

Study 1: Langendorff-isolated heart. There were no significant differences in baseline hemodynamic parameters (heart rate, LVDP, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} , and CF levels) between groups before ischemia. LVDP, dP/dt_{max} , and dP/dt_{min} were all impaired after 25 min ischemia in the control hearts (Fig. 1). The mean LVDP of control hearts at 30 min reperfusion was 18.57 ± 4.67 compared with 73.58 ± 4.42 mmHg before ischemia, which represents a recovery of 25%. Hearts treated with either IPost or EPO at the onset of reperfusion showed,

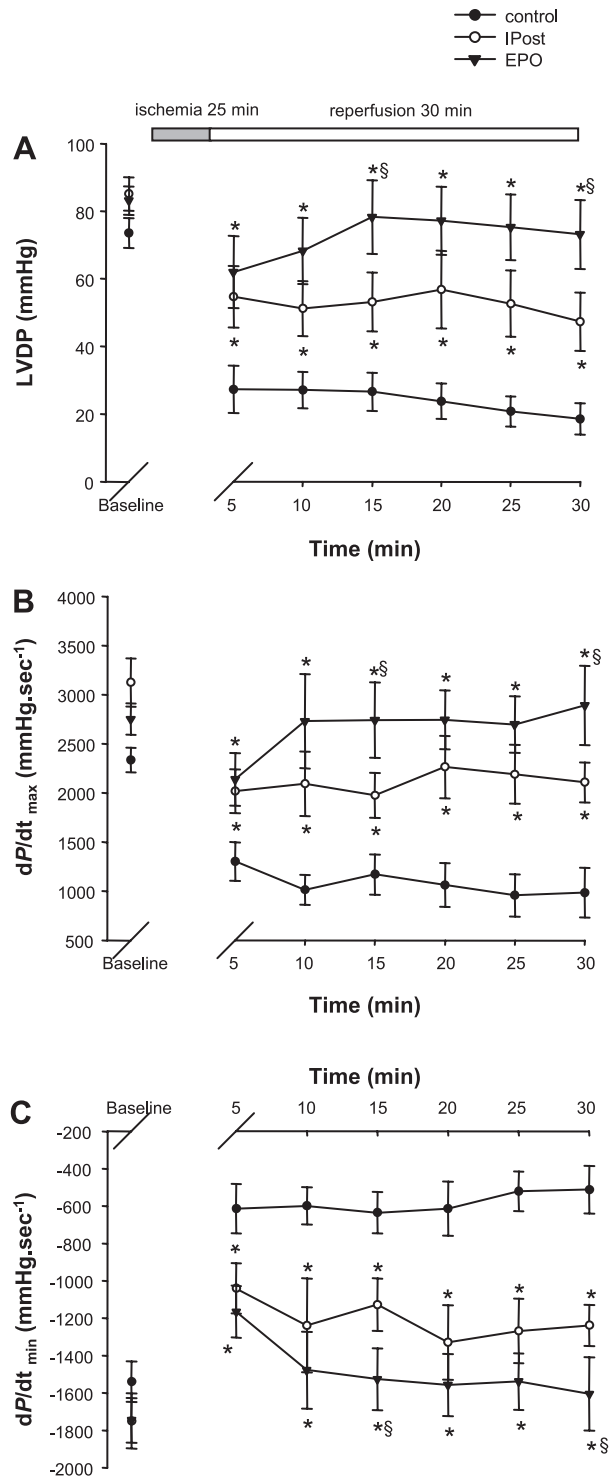


Fig. 1. Time course of changes in left ventricular (LV) function parameters. Effect of ischemic postconditioning (IPost) and erythropoietin (EPO) on LV developed pressure (LVDP; A) and maximal (dP/dt_{max} ; B) and minimal (dP/dt_{min} ; C) value of the first derivative of LV pressure. Data are presented as means \pm SE for control ($n = 12$), IPost ($n = 16$), and EPO ($n = 12$). **P* < 0.05 compared with control; §*P* < 0.05 compared with IPost.

respectively, a 55% and 88% contractile function recovery of LVDP at 30 min reperfusion. LV function was significantly improved in both IPost and EPO groups throughout the reperfusion period, with a significantly better LVDP in the EPO

Table 1. Heart rate and coronary flow data

	Baseline	5 min Reperfusion	30 min Reperfusion
Heart rate, beats/min			
Control	243.7±17.5	220.6±28.3	214.7±29.1
IPost	211.1±17.2	218.3±22.4	203.7±24.5
EPO	184.9±19.6	214.7±25.3	167.5±19.5
Coronary flow, ml/min			
Control	14.2±1.2	10.4±1.0	6.8±0.8
IPost	15.9±0.7	14.6±0.9*	12.3±0.7*
EPO	17.1±1.1	17.2±1.5*†	13.9±1.3*

Values are means ± SE. IPost, ischemic postconditioning; EPO, erythropoietin. * $P < 0.05$ vs. control; † $P < 0.05$ vs. IPost.

group compared with the IPost group at 15 and 30 min reperfusion (73.18 ± 10.23 vs. 48.11 ± 7.92 mmHg at 30 min reperfusion, $P < 0.05$). After 30 min reperfusion, EPO-treated hearts also showed a better dP/dt_{max} (2891.70 ± 404.67 vs. 2108.17 ± 203.58 mmHg/s, $P < 0.05$) and dP/dt_{min} (-1604.37 ± 196.14 vs. -1302.66 ± 119.25 mmHg/s, $P < 0.05$) compared with IPost-treated hearts.

Heart rate and CF data are summarized in Table 1. IPost and EPO treatments did not show any effect on heart rate after 25 min ischemia and during the entire reperfusion period. CF continuously decreased all through the reperfusion time in controls. At 5 and 30 min of reperfusion, CF was significantly higher in the IPost- and EPO-treated groups compared with controls ($P < 0.05$).

As illustrated in Fig. 2, IPost- and EPO-treated hearts exhibited a significant infarct size reduction compared with control hearts ($19.11 \pm 0.84\%$ and $14.36 \pm 0.60\%$, respectively, vs. $36.21 \pm 4.20\%$ of the LV, $P < 0.05$). Interestingly, EPO treatment was significantly more effective in reducing infarct size than IPost ($P < 0.05$).

Study 2: in vivo ischemia-reperfusion. Sixty-two rats were used for surgery. Four were excluded because of technical troubles with the ventilator, and 16 died during or immediately after surgery (5 during ischemia, 4 within the first minutes after reperfusion, and 7 within the following 2 h). The mortality rate was similar in all myocardial infarction groups. Finally, 42 rats were available for analysis 24 h after reperfusion (6 sham-operated, 12 control, 12 IPost, and 12 EPO).

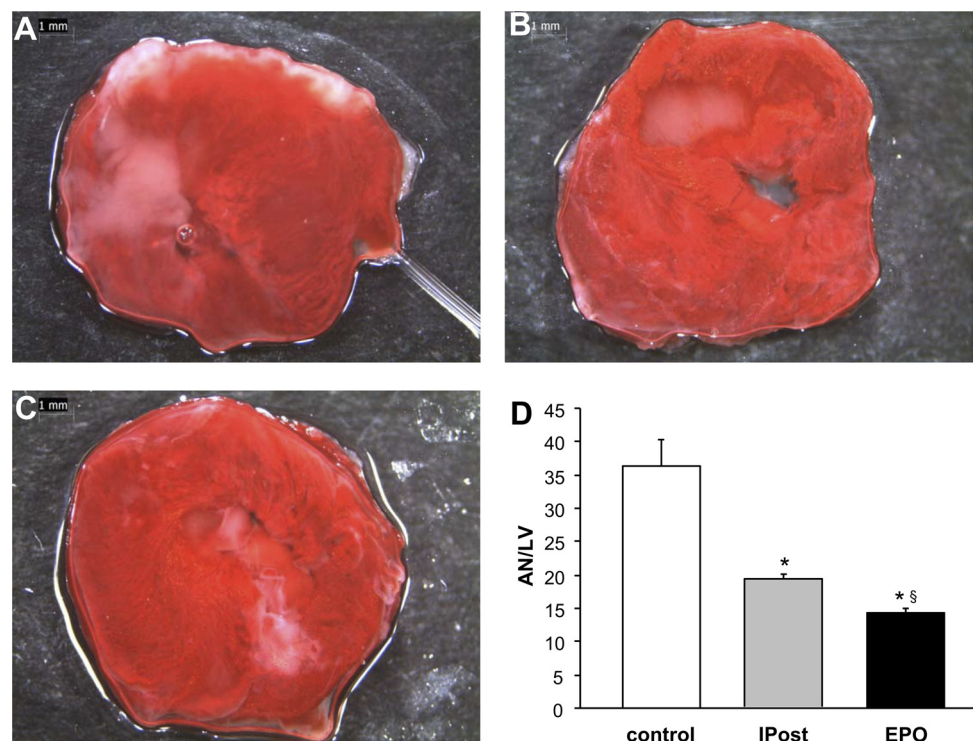
The ischemic area induced by LAD ligation (AAR/LV) did not differ among the three myocardial infarction groups (control = $32.5 \pm 3.2\%$, IPost = $29.6 \pm 2.9\%$, and EPO = $32.0 \pm 4.8\%$, not significant). Both IPost and EPO treatment induced infarct size reduction compared with control ($40.5 \pm 3.6\%$ and $28.9 \pm 3.1\%$, respectively, vs. $53.7 \pm 4.3\%$ of the AAR, $P < 0.05$). Similar to the data observed in *study 1*, EPO decreased infarct size significantly more than IPost ($P < 0.05$).

As shown in Fig. 3, TUNEL-positive cells expressed as a percentage of total nuclei were significantly increased in the ischemic zone in the control group ($15.09 \pm 1.71\%$) compared with the remote myocardium ($1.92 \pm 0.24\%$). IPost and EPO treatments significantly reduced the number of TUNEL-positive cells in the ischemic zone ($8.80 \pm 1.41\%$ and $7.09 \pm 1.51\%$, respectively) versus the control group ($P < 0.05$). Whereas this single shot of the apoptosis at 24 h may not reflect the global apoptotic cell death after reperfusion, it is interesting to note that the apoptosis level assessed 24 h after reperfusion in the ischemic zone was not significantly different between EPO- and IPost-treated rats.

PI3K/Akt and ERK1/2 Pathways are Both Required in IPost- and EPO-Mediated Cardioprotection

To evaluate the respective role of the PI3K and ERK1/2 pathways in EPO- and IPost-mediated cardioprotection, we used pharmacological inhibitors in the Langendorff-isolated rat

Fig. 2. Representative sections of rat hearts stained with triphenyltetrazolium chloride after a global ischemia of 25 min and 2 h reperfusion from the isolated heart experiments. A: control. B: IPost. C: EPO. D: tabulated data from triphenyltetrazolium chloride staining. Area of necrosis (AN) expressed as a percentage of LV area. * $P < 0.05$ vs. control; § $P < 0.05$ vs. IPost; $n = 5$ in each group.



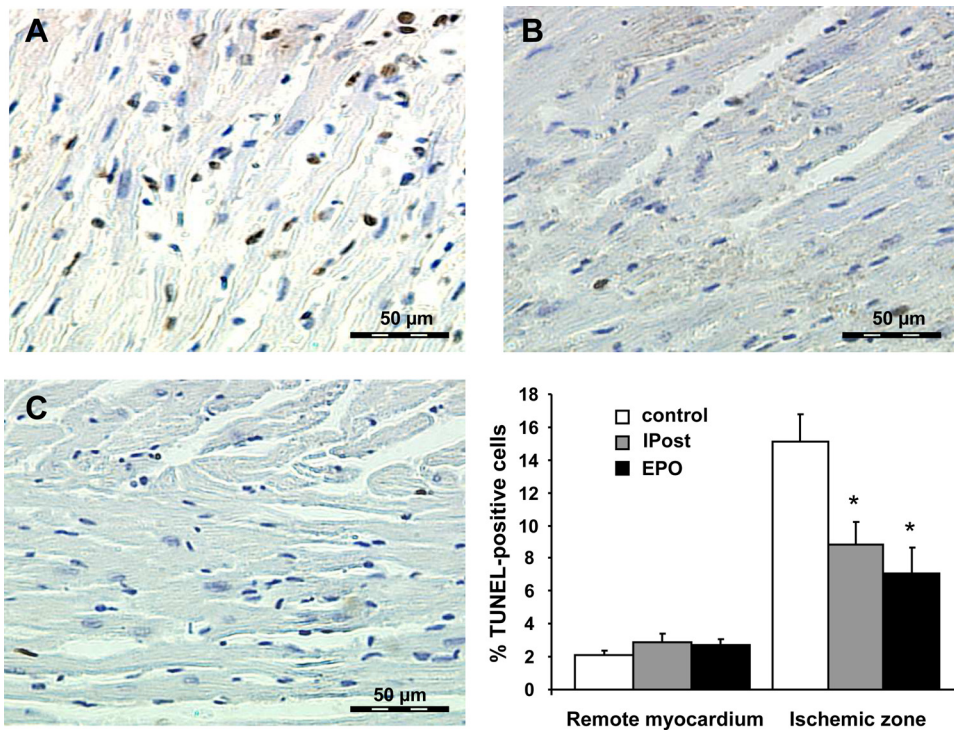


Fig. 3. Effect of IPost and EPO on apoptosis after myocardial infarction. A: control. B: IPost. C: EPO. Apoptotic cardiomyocyte nuclei appear brown stained, whereas terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-negative nuclei appear blue with hematoxylin. Heavy staining of numerous TUNEL-positive cardiomyocytes was observed in the central ischemic region of the LV after 45 min of left anterior descending coronary artery occlusion and 24 h of reperfusion. In contrast, few TUNEL-positive cells were detected in the LV ischemic region of IPost- and EPO-treated hearts. * $P < 0.05$ vs. control; $n = 5$ hearts in each group.

heart study. As illustrated in Fig. 4, the addition of wortmannin, an inhibitor of PI3K/Akt signaling pathway, to IPost- and EPO-treated hearts fully prevented the postischemic recovery of LV function. Furthermore, the protection induced by EPO and IPost was completely abolished by the treatment with PD-98059, an inhibitor of ERK1/2.

EPO Induces Higher Phosphorylation of ERK1/2 and the Downstream Target GSK-3 β

To explain the better cardioprotection afforded by EPO compared with IPost, we evaluated the phosphorylation levels of survival kinases Akt and ERK1/2 and the downstream target GSK-3 β in the isolated perfused hearts at 30 min of reperfusion. As shown in Figs. 5 and 6, there was no significant difference in the levels of total Akt, ERK1/2, and GSK-3 β in the study groups. Thus the levels of phospho-Akt, phospho-ERK1/2, and phospho-GSK-3 β were expressed as their densitometric levels normalized by those levels of each total protein. As illustrated in Fig. 5A, at 30 min of reperfusion, the phosphorylation of myocardial Akt was significantly increased in both IPost- and EPO-treated hearts compared with control hearts. The administration of wortmannin significantly reduced the level of phosphorylated Akt in the myocardium treated with IPost and EPO by 31% and 38%, respectively. As shown in Fig. 5B, phospho-ERK1/2 levels were increased in both IPost and EPO groups compared with controls, although the difference in the IPost group did not reach statistical significance. This EPO-induced phosphorylation of ERK1/2 was significantly attenuated by PD-98059. Contrary to our findings on phospho-Akt, phospho-ERK1/2 levels were significantly higher in the EPO group compared with the IPost group ($P < 0.05$). Furthermore, EPO induced a significantly stronger phosphorylation of GSK-3 β than IPost, which is in line with a higher increased phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 6).

DISCUSSION

The novelty and significance of this study arise in the demonstration that using three cycles of 10 s ischemia/10 s reperfusion, EPO administered at the time of myocardial reperfusion was significantly more effective than IPost to protect the rat heart against postischemic myocardial injury. To our knowledge, this is the first demonstration that EPO has a clear advantage over IPost using head-to-head comparisons in isolated heart and in vivo. The mechanism underlying IPost- and EPO-induced cardioprotection involves the activation of PI3K/Akt and the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 and their downstream target GSK-3 β . The increased resistance to myocardial ischemia induced by EPO seems to be mediated by an enhanced phosphorylation of GSK-3 β as a consequence of a greater ERK1/2 phosphorylation.

EPO as a Pharmacologic Postconditioning Agent

The cardioprotection afforded by IPost has been demonstrated in several animal species, both in vivo as well as ex vivo (10, 19, 44, 48) and recently in humans (42). Previous studies have demonstrated the antiapoptotic effect of IPost (18, 31). EPO has also been shown to induce cardioprotection in experimental models (2, 20, 24, 26), mainly by decreasing cardiomyocytes apoptosis after the ischemic insult (8). Whereas IPost is limited to patients with ongoing acute myocardial infarction subjected to coronary angioplasty, the present study suggests that EPO is a valuable pharmacological postconditioning agent, maybe more effective than IPost in preventing reperfusion injury. In a pilot clinical study, Lipsic et al. (21) examined the effect of EPO in acute myocardial infarction and showed that a single IV bolus of the EPO analog darbepoetin alfa in patients with first acute ST-segment elevation myocardial infarction is safe and well tolerated. Large,

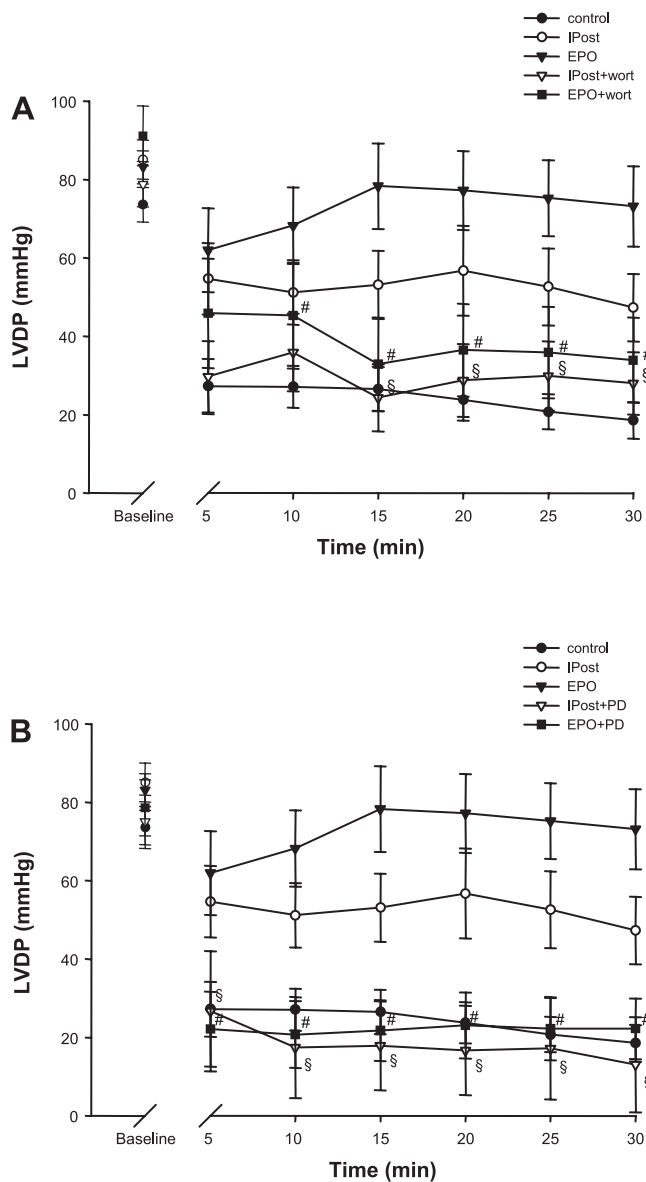


Fig. 4. Time course of the effect of wortmannin (Wort; A) and PD-98059 (PD; B) on IPost- and EPO-induced LV function recovery. Data are presented as means \pm SE for IPost ($n = 16$), EPO ($n = 12$), IPost + Wort ($n = 10$), EPO + Wort ($n = 10$), IPost + PD ($n = 11$), and EPO + PD ($n = 8$). § $P < 0.05$ compared with IPost; # $P < 0.05$ compared with EPO.

multicenter studies are underway to determine whether this new treatment strategy is able to improve the clinical outcome in patients presenting with acute myocardial infarction.

Role of Akt-ERK1/2-GSK-3 β in EPO- and IPost-Mediated Cardioprotection

We showed here that inhibitors of the prosurvival kinases Akt and ERK1/2 significantly suppressed the protective effects of IPost and EPO in the isolated-heart model, underlying the pivotal role of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways in protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. These observations are in accordance with other studies that have also implicated these prosurvival kinases in EPO- and IPost-mediated cardioprotection in other experimental models, in vitro

and or in vivo (2, 15, 34). In isolated rat hearts, U-0126, an inhibitor of MEK1/2 administered at the time of reperfusion, blocked EPO-induced protection (2). In an infant rabbit-perfused heart model, the protection observed after the administration of EPO for 15 min before ischemia was abolished when

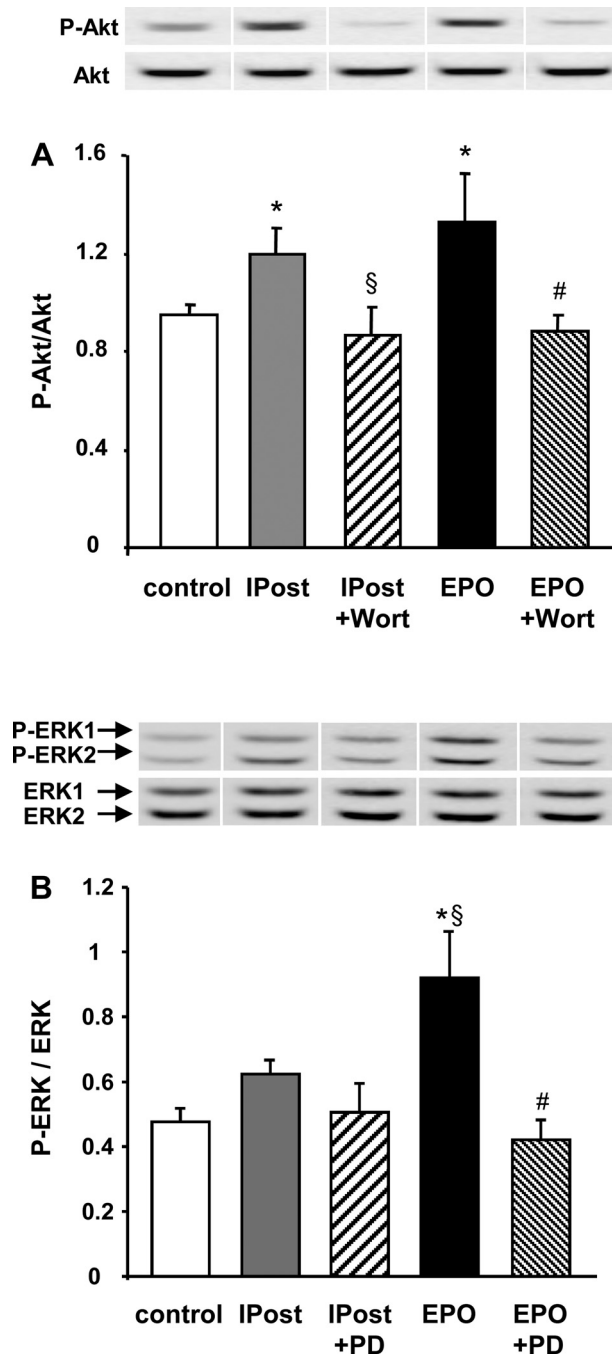


Fig. 5. Western blot analysis of Akt (A) and ERK1/2 (B) phosphorylation in hearts subjected to ischemia-reperfusion in the presence and absence of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor Wort and ERK1/2 inhibitor PD. Top: representative pieces of immunoblots of phosphorylated Akt (p-Akt) and total Akt (A) and phosphorylated ERK1/2 (p-ERK) and total ERK (B) in LV homogenates from hearts subjected to ischemia-reperfusion. Bottom: bar graphs represent means \pm SE of the densitometry of p-Akt-to-Akt ratio (A) and p-ERK1/2-to-ERK1/2 ratio (B). * $P < 0.05$ vs. control; § $P < 0.05$ vs. IPost; # $P < 0.05$ vs. EPO; $n = 6$ in each group.

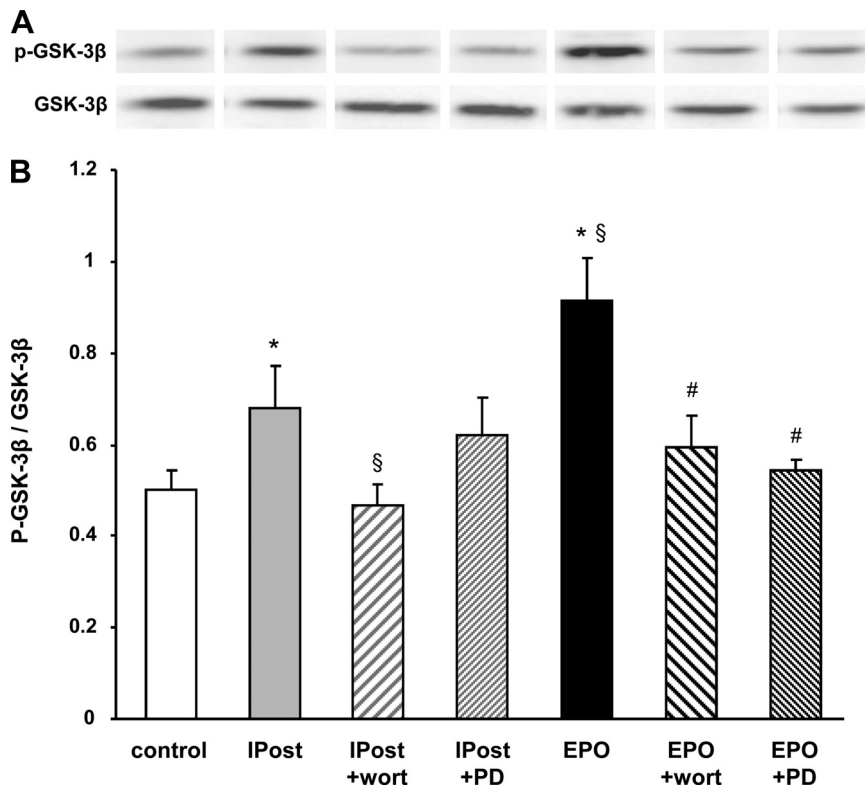


Fig. 6. Western blot analysis of GSK-3 β phosphorylation in hearts subjected to ischemia-reperfusion in the presence and absence of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor Wort and ERK1/2 inhibitor PD. A: representative bands from Western blots of phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β) and total GSK-3 β in LV homogenates from hearts subjected to ischemia-reperfusion. B: means \pm SE of the densitometry of p-GSK-3 β -to-GSK-3 β ratio. * P < 0.05 vs. control; § P < 0.05 vs. IPost; # P < 0.05 vs. EPO; n = 6 in each group.

EPO was coadministered with an inhibitor of ERK1/2 (PD-98059) (47). Consistent with their findings, our study also observed that PD-98059 abolished cardioprotection achieved by EPO. In contrast, Hanlon et al. (13) showed that U-O126, infused just before EPO treatment, blocked the EPO-induced phosphorylation of ERK1/2 but did not abolish the improvement of postischemic recovery of LVDP in isolated rat hearts. Our study provides further support for the importance of the ERK1/2 pathway in EPO-induced cardioprotection. Contrary to that shown in EPO-treated hearts, Western blot analysis showed no significant increases in the phosphorylation of ERK1/2 in the IPost group compared with controls. However, PD-98059, an inhibitor of ERK1/2, significantly inhibited IPost-induced cardioprotection. This may be due to the small time window of activation of ERK1/2 around the beginning of reperfusion. The activation of ERK1/2 occurs within the first minutes following IPost (2). By the time the samples were taken after 30 min of reperfusion, the signal may have become dissipated or regulated by phosphatases. However, ERK1/2 phosphorylation remained significantly stronger at 30 min in EPO-treated hearts compared with IPost, highlighting a critical role for ERK1/2 in EPO-induced cardioprotection. Taken together, our findings suggest that the phosphorylation of both Akt and ERK1/2 is necessary to trigger the mechanism of EPO- and IPost-induced protection at the time of reperfusion after a prolonged ischemia.

Opposite results exist regarding the role of GSK-3 β phosphorylation in the postconditioning mechanisms (9, 27, 40). GSK-3 β is a putative regulatory factor of the threshold for opening of the mitochondrial permeability transition pore, and several cytoprotective signals converge to this kinase (16), including ERK1/2 and Akt. Activated ERK can phosphorylate Thr43 of

GSK-3 β , which primes GSK-3 β for subsequent Ser9 phosphorylation (6). The inactivation of mitochondrial GSK-3 β by Ser9 phosphorylation has been shown to be primarily important for antiapoptosis resistance of cardiomyocytes afforded by EPO receptor activation (28). The infarct size-limiting effect of EPO has been shown to be linked to the phosphorylation of Ser9 in GSK-3 β (26). The increased resistance to myocardial ischemia observed here with EPO may be mediated by the higher phosphorylation of GSK-3 β as a consequence of the greater ERK1/2 phosphorylation.

Experimental Rat Models and Cardioprotection

Although investigators have not observed any benefit of IPost on myocardial infarct size using in vivo rat models (7, 22), we found the cardioprotective effects of three cycles of 10 s ischemia/10 s reperfusion in our both Langendorff and in vivo rat models. Our results are in accordance with other studies using the same postconditioning regimen in an in vivo rat model (18, 19, 47). The reasons for these discrepancies are unknown. It may involve a different duration of global ischemia, different postconditioning regimens, and a possible effect of sex difference (7).

Conflicting results exist regarding the efficacy of EPO and IPost in female rats (4, 7, 12, 32). Dow and Kloner (7) showed that IPost was ineffective in reducing cardiac infarct size induced by either 30 min or 45 min ischemia in female rats (7). More recently, Penna et al. (32) showed that IPost significantly reduced infarct size and postischemic systolic dysfunction in females after 30 min ischemia, although the effect on infarct size was smaller in female group compared with males. Chan et al. (4) showed a protective effect of EPO in isolated female

rat hearts, whereas Hale et al. (12) showed that the administration of EPO failed to improve long-term healing or cardiac function after myocardial infarction in the female rat (12). In our models of ischemia-reperfusion, both IPost and EPO exhibited positive effects regarding postischemic cardiac function recovery and RISK signaling pathways activation in female.

Limitations

Only one postconditioning protocol with three cycles of 10 s reperfusion/10 s ischemia at the time of reperfusion has been compared with EPO. However, we chose this protocol as it has been well validated by previous experimental studies, in both isolated-heart (22) and in vivo ischemia-reperfusion rat models (18, 19, 47). We used only female rats to avoid variability in response to treatments. However, it would be of interest to directly compare the efficacy of both IPost and EPO in male and female rat models. Moreover, we did not explore the temporal changes in myocardial salvage kinases, Akt, ERK1/2, and GSK-3 β phosphorylation during reperfusion since our results at 30 min of reperfusion show significant differences between the groups. Finally, we did not evaluate Akt, ERK1/2, and GSK-3 β activity. An increase in phosphorylation is not necessarily accompanied by increased kinase activity (41).

Conclusion

EPO and IPost share similar intracellular cardioprotective pathways. However, in our models, EPO administered at the time of reperfusion exhibited better protective effects than IPost against reperfusion injury through a higher increase of GSK-3 β . These data reinforce the great hope in EPO as a pharmacological agent of postconditioning.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Legras and Jerome Roux from the animal facilities for taking care of animals, Robert Filmon (Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques) for technical assistance, and Danielle Feuvray for helpful comments and discussions.

GRANTS

N. Ghaboura and S. Tamareille were supported by a fellowship from the Conseil Général du Maine et Loire.

DISCLOSURES

No conflicts of interest are declared by the author(s).

REFERENCES

- Baker JE, Kozik D, Hsu AK, Fu X, Tweddell JS, Gross GJ. Darbepoetin alfa protects the rat heart against infarction: dose-response, phase of action, and mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 337–345, 2007.
- Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 100: 397–403, 2005.
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4802–4806, 2003.
- Chan CY, Chen YS, Lee HH, Huang HS, Lai YL, Chen CF, Ma MC. Erythropoietin protects post-ischemic hearts by preventing extracellular matrix degradation: role of Jak2-ERK pathway. *Life Sci* 81: 717–723, 2007.
- Christian TF, Schwartz RS, Gibbons RJ. Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 86: 81–90, 1992.
- Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 19: 159–170, 2005.
- Dow J, Kloner RA. Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 12: 153–163, 2007.
- Gao E, Boucher M, Chuprun JK, Zhou RH, Eckhart AD, Koch WJ. Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H60–H68, 2007.
- Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation* 117: 2761–2768, 2008.
- Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H1654–H1661, 2007.
- Guillard C, Chretien S, Pelus AS, Porteu F, Muller O, Mayeux P, Duprez V. Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i) protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *J Biol Chem* 278: 11050–11056, 2003.
- Hale SL, Sesti C, Kloner RA. Administration of erythropoietin fails to improve long-term healing or cardiac function after myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 46: 211–215, 2005.
- Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E. Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J* 19: 1323–1325, 2005.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61: 448–460, 2004.
- Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Tsukamoto O, Wakeno M, Myoishi M, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 19: 33–40, 2005.
- Juhászova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113: 1535–1549, 2004.
- Kaygisiz Z, Erkasap N, Yazihan N, Sayar K, Ataoglu H, Uyar R, Ikizler M. Erythropoietin changes contractility, cAMP, and nitrite levels of isolated rat hearts. *J Physiol Sci* 56: 247–251, 2006.
- Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release. *Shock* 29: 761–768, 2008.
- Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 62: 74–85, 2004.
- Lipsic E, Schoemaker RG, van der Meer P, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* 48: 2161–2167, 2006.
- Lipsic E, van der Meer P, Voors AA, Westenbrink BD, van den Heuvel AF, de Boer HC, van Zonneveld AJ, Schoemaker RG, van Gilst WH, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovasc Drugs Ther* 20: 135–141, 2006.
- Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, Lamers JM, Duncker DJ. Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1551–H1560, 2007.
- Miki T, Miura T, Yano T, Takahashi A, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Nishihara M, Naitoh K, Ohori K, Shimamoto K. Alteration in erythropoietin-induced cardioprotective signaling by

- postinfarct ventricular remodeling. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 68–75, 2006.
24. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11612–11617, 2003.
 25. Mudalagiri NR, Mocanu MM, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Yellon DM. Erythropoietin protects the human myocardium against hypoxia/reoxygenation injury via phosphatidylinositol-3 kinase and ERK1/2 activation. *Br J Pharmacol* 153: 50–56, 2008.
 26. Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H748–H755, 2006.
 27. Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M, Marber MS. Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circ Res* 103: 307–314, 2008.
 28. Ohori K, Miura T, Tanno M, Miki T, Sato T, Ishikawa S, Horio Y, Shimamoto K. Ser9 phosphorylation of mitochondrial GSK-3beta is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2079–H2086, 2008.
 29. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 20655–20662, 2004.
 30. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest* 112: 999–1007, 2003.
 31. Penna C, Perrelli MG, Raimondo S, Tullio F, Merlino A, Moro F, Geuna S, Mancardi D, Pagliaro P. Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts. *Biochim Biophys Acta* 1787: 794–801, 2009.
 32. Penna C, Tullio F, Merlino A, Moro F, Raimondo S, Rastaldo R, Perrelli MG, Mancardi D, Pagliaro P. Postconditioning cardioprotection against infarct size and post-ischemic systolic dysfunction is influenced by gender. *Basic Res Cardiol* 104: 390–402, 2009.
 33. Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H522–H529, 2007.
 34. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 100: 187–197, 2005.
 35. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56: 786–794, 1977.
 36. Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM. Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 29: 258–267, 2008.
 37. Rochetaing A, Chapon C, Marescaux L, Le Bouil A, Furber A, Kreher P. Potential beneficial as well as detrimental effects of chronic treatment with lisinopril and (or) spironolactone on isolated hearts following low-flow ischemia in normal and infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 864–872, 2003.
 38. Sharma A, Singh M. Possible mechanism of cardioprotective effect of angiotensin preconditioning in isolated rat heart. *Eur J Pharmacol* 406: 85–92, 2000.
 39. Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Hausenloy DJ, Yellon DM. Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway. *Basic Res Cardiol* 102: 453–459, 2007.
 40. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res* 104: 15–18, 2009.
 41. Smith CC, Mocanu MM, Bowen J, Wynne AM, Simpkin JC, Dixon RA, Cooper MB, Yellon DM. Temporal changes in myocardial salvage kinases during reperfusion following ischemia: studies involving the cardioprotective adipocytokine apelin. *Cardiovasc Drugs Ther* 21: 409–414, 2007.
 42. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 112: 2143–2148, 2005.
 43. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaita MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 308: 990–994, 2003.
 44. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of “modified reperfusion” protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95: 230–232, 2004.
 45. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 18: 1031–1033, 2004.
 46. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357: 1121–1135, 2007.
 47. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, Jiang R, Wang N, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Caffrey JL, Vinten-Johansen J. Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1444–H1451, 2008.
 48. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H579–H588, 2003.

4. Discussion

Dans cette première partie du travail nous avons démontré que dans nos modèles expérimentaux, l'EPO administrée au moment de la reperfusion semble être plus efficace que le IPost ischémique dans la prévention des lésions d'I/R. Les modèles qui ont été utilisés sont le modèle de cœur de rat isolé perfusé et le modèle chez le rat in vivo. Dans ces modèles le protocole du IPost utilisé (3 cycles de 10 sec d'ischémie suivis de 10 sec de reperfusion) a été déjà validé par des études expérimentales réalisées chez le rat (Kin et al. 2004 ; Kin et al. 2008 ; Zatta et al. 2008). Cependant, d'autres études ont démontré l'absence de l'effet cardioprotecteur du IPost chez le rat. Dow et Kloner ont rapporté l'absence de la cardioprotection induite par différents protocoles IPost dans un modèle d'IDM in vivo chez le rat après une ischémie de 45 ou de 30 minutes (Dow et Kloner. 2007). La durée de l'ischémie semble jouer un rôle important dans l'effet cardioprotecteur du IPost. Manintveld et al. ont démontré qu'après une ischémie de 15 ou 30 minutes il n'y avait pas d'effet bénéfique d'IPost chez le rat. Par contre, le même protocole IPost induisait une diminution de la taille d'infarctus après 45 ou 60 minutes d'ischémie (Manintveld et al. 2007).

L'analyse des voies de signalisation a expliqué cette meilleure cardioprotection observée avec l'EPO dans le modèle de cœur de rat isolé perfusé. L'inhibition de la voie PI3K/Akt ou de la voie ERK1/2 par des inhibiteurs spécifiques a inhibé dans notre modèle l'effet cardioprotecteur du IPost et de l'EPO. Ces résultats sont en parallèle avec ce qui a été rapporté dans la littérature sur l'implication de ces deux voies dans le mécanisme du IPost et de l'EPO. Dans un modèle de cœur de rat isolé, une inhibition de l'effet cardioprotecteur de l'EPO a été observée en utilisant au moment de la reperfusion le U-0126, un inhibiteur spécifique de la voie MEK1/2 (Bullard et al. 2005). Une autre étude réalisée sur des cœurs des lapins isolés perfusés, a démontré l'absence de l'effet cardioprotecteur de l'EPO administrée 15 minutes avant ischémie quand la voie ERK1/2 a été inhibée par le PD-98059 (Rafiee et al. 2005). Par contre, une dissociation entre la phosphorylation de ERK1/2 et l'effet cardioprotecteur de l'EPO a été reportée par une étude qui a démontré que le U-0126 inhibait l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 induite par l'EPO, mais n'altèrait pas son effet sur la récupération des fonctions hémodynamiques dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé (Hanlon et al. 2005).

Notre travail renforce l'importance de la voie ERK1/2 dans le mécanisme de l'EPO. L'analyse Western Blot a démontré une augmentation significative de la phosphorylation d'ERK1/2 dans le groupe EPO. À l'inverse, dans le groupe IPost une absence de l'augmentation du taux de phospho-ERK1/2 a été détectée malgré l'inhibition de l'effet cardioprotecteur en présence de l'inhibiteur spécifique de cette voie. Cette absence d'augmentation de phosphorylation d'ERK1/2 dans le groupe IPost peut être la conséquence d'une disparition ou d'une atténuation du signal sous l'action des phosphatases, surtout que nous avons réalisé l'analyse des voies de signalisation 30 minutes après la reperfusion. Néanmoins, une augmentation significative de la phospho-ERK1/2 en réponse à l'EPO était toujours détectée 30 minutes après la reperfusion.

Les résultats expérimentaux concernant l'implication de la GSK-3 β dans le mécanisme du IPost sont contradictoires (Gomez et al. 2007 ; Nishino et al. 2008 ; Skyschally et al. 2009). GSK-3 β est un effecteur en commun de plusieurs voies de signalisation incluant PI3K/Akt et ERK1/2 (Juhaszova et al. 2004). Une fois phosphorylée sur la Ser⁹, l'activité de la GSK-3 β sur l'ouverture du mPTP est inhibée, ce qui engendre une cardioprotection (Ding et al. 2005). Le rôle de la GSK-3 β dans la cardioprotection induite par l'EPO a été bien démontré par plusieurs études expérimentales qui ont montré une relation entre l'augmentation de la phospho-GSK-3 β et l'effet anti-apoptotique de l'EPO (Ohori et al. 2008) ainsi que sa capacité à réduire la taille de la zone infarctée (Nishihara et al. 2006). Ce travail a mis en évidence le rôle de la GSK-3 β dans le mécanisme de la cardioprotection du IPost et de l'EPO.

Si ces résultats ouvrent des perspectives d'utilisation de l'EPO comme un agent pharmacologique du postconditionnement, plusieurs obstacles sont encore à franchir avant son application clinique. L'étude de son effet sur la prévention des lésions d'I/R dans des modèles plus complexes associant des facteurs de risque cardio-vasculaire (l'objectif de la deuxième partie du travail) semble être d'un intérêt clinique majeur. Plusieurs essais cliniques testant l'effet cardioprotecteur de l'EPO chez des patients ayant un IDM sont en cours de réalisation.

Projet 2 : Étude de rôle du diabète sur l'effet cardioprotecteur de l'érythropoïétine

1. Introduction

Malgré les progrès réalisés dans les stratégies de reperfusion coronaire, la mortalité post-infarctus reste élevée chez les patients diabétiques, suite à une extension plus importante des lésions d'athérosclérose, à une hypertrophie et un dysfonctionnement ventriculaire gauche plus prononcés observés chez ces patients (Flaherty et al. 2005). Alors que ces patients auraient besoin de moyens cardioprotecteurs limitant la survenue des lésions de reperfusion, il a été rapporté que le myocarde diabétique pouvait être résistant aux interventions cardioprotectrices. Dans différents modèles expérimentaux, l'effet cardioprotecteur du préconditionnement ischémique (Tosaki et al. 1996 ; Kersten et al. 2000) ou d'un agent pharmacologique cardioprotecteur tels que la morphine (Gross et al. 2007), l'isoflurane (Tanaka et al. 2002), la diazoxide (Kersten et al. 2001), la remifentanil (Kim et al. 2010), était absent en présence du diabète type 1. L'altération des voies de signalisation cardioprotectrices (la voie PI3K/Akt, la voie ERK1/2 et la voie JAK/STAT) a été incriminée (Gross et al. 2007). La cardioprotection induite par l'EPO active ces mêmes voies de signalisation (Parsa et al. 2003 ; Hanlon et al. 2005 ; Bullard et al. 2005). Cependant, l'effet de l'EPO n'a jamais été étudié en présence de diabète type 1.

L'insulino-résistance caractérisée par une hyperinsulinémie et une normoglycémie est un autre facteur de risque important d'IDM (Isomaa et al. 2001). Son effet sur la cardioprotection induite par les différentes interventions cardioprotectrices n'avait jamais été étudié.

L'objectif de ce travail était d'identifier si la cardioprotection induite par l'EPO était maintenue en présence d'un diabète type 1 induit par la STZ et d'une insulino-résistance induite par un régime hypercalorique, dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé selon la technique de Langendorff. Les principales voies de

signalisation impliquées dans le mécanisme d'action de l'EPO (PI3K/Akt et ERK1/2) ainsi que la GSK-3 β ont été aussi analysées dans ces deux modèles.

2. Matériels et méthodes

2.1. Modèle animal

L'ensemble des animaux utilisés pour cette étude était des rats femelles de souche Wistar âgées de 10 semaines (pesant entre 200 et 250g) répartis au hasard dans l'un des ces 3 groupes :

- 1) Groupe des rats normaux ; les rats ont été soumis à un régime alimentaire normal pendant 4 semaines.
- 2) Groupe des rats diabétiques ; les rats ont eu une injection du STZ pour induire le diabète type 1.
- 3) Groupe des rats insulino-résistants ; les rats ont été soumis à un régime alimentaire hypercalorique pour induire l'insulino-résistance.

2.1.1. Protocole d'induction du diabète de type 1

Le diabète type 1 a été induit en utilisant la STZ. La STZ provoque la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques, responsables de la production d'insuline, ce qui va entraîner le diabète de type 1.

- À J0, la STZ (65mg/kg), dissoute dans une solution de NaCl a été injectée par voie intra-péritonéale chez les rats.
- À J6, quelques gouttes de sang ont été prélevées au niveau de la queue des rats maintenus à jeun depuis 24h. Pour chaque rat, deux mesures de la glycémie ont été réalisées par un glycomètre Medisense Optium Xceed (Abbott, Rungis, France). Lorsqu'un rat présentait deux analyses supérieures ou égales à 120mg/dl, le diabète était confirmé et le rat inclus dans l'étude. En cas de doute, une troisième mesure était réalisée : 2 des 3 analyses devaient être supérieures ou égales à 120mg/dl pour confirmer le diabète et inclure le rat dans l'étude.
- À J28, une mesure supplémentaire de confirmation de la glycémie à jeun a été faite avant de réaliser le prélèvement du cœur. Cette mesure a été faite aussi chez tous les rats normaux et insulino-résistants.

2.4. Protocole expérimental

Tous les cœurs ont été soumis à une période de 20 minutes de stabilisation suivie de 25 minutes d'ischémie globale totale. Les cœurs avec une pression développée ventriculaire gauche inférieure à 70 mmHg en fin de stabilisation n'ont pas été inclus dans l'étude. Dans chacun des groupes de rats normaux, diabétiques et insulino-résistants les cœurs ont été affectés au hasard dans l'un des deux sous-groupes suivants :

- 1) Groupe contrôle : la reperfusion a eu lieu sans aucune intervention.
- 2) Groupe EPO : une dose de 1000 UI de darbepoietin alpha (Aranesp[®], Amgen)/kg de poids corporel a été injectée au moment de la reperfusion, au niveau de la canule qui maintient l'aorte.

Six cœurs de chaque sous-groupe ont été reperfusés pendant 30 minutes puis les VG ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour l'analyse des voies de signalisation en Western Blot.

Cinq cœurs de chaque sous-groupe ont été perfusés pendant 2 heures pour la mesure de la taille d'infarctus par le marquage TTC et pour le marquage TUNEL.

Pour vérifier si les cœurs des rats diabétiques développaient une résistance à l'EPO, un sous-groupe des rats diabétiques a été ajouté avec une plus forte dose d'EPO : 5000 IU/kg de poids corporel de darbepoietin alpha (Aranesp[®], Amgen) injectées au moment de la reperfusion. Ces cœurs ont été reperfusés pendant 2h pour la mesure de la taille d'infarctus par le marquage TTC.

2.5. Détection des noyaux apoptotiques par le marquage TUNEL

Le marquage des cardiomyocytes a été fait par la technique du TUNEL "*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling*". C'est une technique qui permet de détecter d'une manière rapide les cellules apoptotiques in situ. Le système utilisé pour ce marquage était le "*Dead End Colorimetric TUNEL system*" (Promega Corporation, Madison, WI). Des coupes du myocarde inclus en paraffine ont été utilisées pour quantifier les cardiomyocytes apoptotiques.

Ce système permet de détecter les cellules apoptotiques par détection de fragments d'ADN nucléaires, marqueurs biochimiques importants de l'apoptose. Les changements morphologiques observés dans les noyaux des cellules apoptotiques sont dus en partie à la génération de fragments d'ADN suite à l'activation des endonucléases. Généralement, l'ADN des cellules apoptotiques est clivé en plusieurs fragments de 180 à 200 paires de base. Le marquage TUNEL identifie les fragments d'ADN suite à l'incorporation de la *Biotinylated nucleotide* dUTP à leurs extrémités 3'-OH libres. Cette incorporation est favorisée par l'enzyme Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (dUTP). Une solution de streptavidine (Streptavidin HRP) marquée à la peroxydase se lie ensuite à ces nucléotides biotinylés. Ce complexe est détecté ensuite en utilisant le substrat de la peroxydase, une solution de peroxyde d'hydrogène et du chromogène stable le diaminobenzidine (DAB). Les noyaux apoptotiques apparaissent alors en marron foncé.

Cette technique est une succession de plusieurs étapes séparées par 2 à 3 lavages au PBS (Phosphate buffered saline) :

- a. Déparaffinage des coupes. Deux rinçages par du toluène permettent de déparaffiner les coupes.
- b. Réhydratation des coupes par 5 bains d'éthanol à 100%, 90%, 85%, 75% et 50%.
- c. Fixation des coupes en les incubant dans du paraformaldéhyde.
- d. Incubation dans la protéinase K (20 µg/ml) pendant 20 min.
- e. Refixation des tissus.
- f. Séchage des coupes, et incubation dans un mélange de réactif TUNEL dans une chambre humide à 37°C pendant 60 min.
- g. Deux incubations de 15 min dans une solution du NaCl+citrate de sodium.
- h. Blocage des peroxydases endogènes en immergeant les coupes dans de l'hydrogène peroxydase (0.3%) pour 5 min.
- i. Incubation dans du streptavidine pour 30 min.
- j. Incubation dans du DAB/H₂O₂ pour 10 min.
- k. Et finalement incubation dans de l'hématoxyline pendant 2 min permettant la coloration des cardiomyocytes vivants en bleu.
- l. Puis déshydratation des coupes avant lecture.

2.1.2. Protocole d'induction de l'insulino-résistance

L'insulino-résistance a été induite en soumettant les rats à un régime hypercalorique pendant 4 semaines. Ce régime était composé de 35% de lipides, 35% de carbohydrates et de 22% de protéines. Vingt-huit jours après le début du régime, un prélèvement sanguin au niveau de l'artère abdominale a été réalisé sous anesthésie et juste avant le prélèvement du cœur. Ces échantillons du sang ont été utilisés pour l'analyse du taux d'insuline (Rat Insulin ELISA kit, Linco Research, USA), de la leptine (Rat Leptin ELISA kit, Linco Research, USA) et des triglycérides (Roche Modular system, Roche Diagnostics) (partie réalisée dans le laboratoire d'analyse biochimique du CHU d'Angers). Ce prélèvement a eu lieu aussi chez les 2 autres groupes de rats normaux et diabétiques avant prélèvement du cœur, pour évaluer ces paramètres chez tous les rats utilisés dans l'expérience.

2.2. Mesure de la pression artérielle

Chez certains animaux choisis au hasard de chaque groupe de rats, la pression artérielle a été mesurée en utilisant un système de mesure non invasive à la queue du rat, et qui est connecté à un logiciel LE 5002[®] (BIOSEB, Chaville, France). Cette mesure a été faite sur un rat éveillé accoutumé au préalable à l'appareil de mesure.

- À J20 de l'inclusion les rats ont été habitués quotidiennement au système durant 7 jours.
- À J27, 10 mesures pour chaque rat ont été réalisées le jour qui précède le sacrifice.

2.3. Modèle expérimental

Le modèle de cœur isolé perfusé a été utilisé pour réaliser les expériences sur les différents groupes de ce projet (cf. projet 1).

La prise des photos (10 photos/coupes) a été faite au moyen d'un microscope Olympus BX40 à Gx40 (partie réalisé au Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques, Université d'Angers). Le nombre de noyaux apoptotiques (colorés en marron) a été évalué par deux expérimentateurs en utilisant un logiciel de planimétrie (Image J).

2.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel StatView version 5.0. Les différences entre les groupes ont été évaluées par un test ANOVA suivi d'un test Student-Newman-Keuls post hoc. Pour les paramètres hémodynamiques un test ANOVA pour mesures répétées a été réalisé. Le seuil de significativité a été fixé pour $p < 0,05$.

3. Résultats

Les résultats de ce projet ont fait l'objet d'un article : **Diabetes Mellitus Abrogates Erythropoietin-Induced Cardioprotection against Ischemic-Reperfusion Injury by Alteration of the RISK/GSK-3 β Signalling**, en révision favorable dans *Basic Research in Cardiology*.

Editorial Manager(tm) for Basic Research in Cardiology
Manuscript Draft

Manuscript Number: BRC-D-10-00123

Title: Diabetes Mellitus Abrogates Erythropoietin-Induced Cardioprotection against Ischemic-Reperfusion Injury by Alteration of the RISK/GSK-3 β Signalling

Article Type: Original Contribution

Keywords: Diabetes; erythropoietin; ischemia; cardioprotection; postconditioning.

Corresponding Author: Pr Fabrice Prunier, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: UPRES EA 3860, Protection et Remodelage du Myocarde; Université d'Angers, Faculté de Médecine and CHU d'Angers, Service de Cardiologie

First Author: Nehmat Ghaboura

Order of Authors: Nehmat Ghaboura; Sophie Tamareille, PhD; Pierre-Henri Ducluzeau, MD, PHD; Anne Croué, MD; Yves Tourmen, MD; Daniel Henrion, PhD; Alain Furber, MD, PhD; Fabrice Prunier, MD, PhD

Abstract: Recent studies reported cardioprotective effects of erythropoietin (EPO) against ischemia-reperfusion (I/R) injury through activation of the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway. As RISK has been reported to be impaired in diabetes and insulin resistance syndrome, we examined whether EPO-induced cardioprotection was maintained in rat models of type 1 diabetes and insulin resistance syndrome.

Isolated hearts were obtained from three rat cohorts: healthy controls, streptozotocin (STZ)-induced diabetes, and high-fat diet (HFD)-induced insulin resistance syndrome. All hearts underwent 25min ischemia and were assigned to receive either no intervention or a single dose of EPO at the onset of reperfusion.

In hearts from healthy controls, EPO decreased infarct size ($14.36 \pm 0.60\%$ and $36.22 \pm 4.20\%$ of left ventricle in EPO-treated and untreated hearts, respectively, $p < 0.05$) and increased phosphorylated forms of Akt, ERK1/2, and their downstream target GSK-3 β . In hearts from STZ-induced diabetic rats, EPO did not decrease infarct size ($32.05 \pm 2.38\%$ and $31.88 \pm 1.87\%$ in EPO-treated and untreated diabetic rat hearts, respectively, NS) nor did it increase phosphorylation of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β . In contrast, in hearts from HFD-induced insulin resistance rats, EPO decreased infarct size ($18.66 \pm 1.99\%$ and $34.62 \pm 3.41\%$ in EPO-treated and untreated HFD rat hearts, respectively, $p < 0.05$) and increased phosphorylation of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β . Administration of GSK-3 β inhibitor SB216763 was cardioprotective in diabetic rat hearts.

STZ-induced diabetes abolished EPO-induced cardioprotection against I/R injury through a disruption of upstream signalling of GSK-3 β . In conclusion, direct inhibition of GSK-3 β may provide an alternative strategy to protect diabetic hearts against I/R injury.

To: Gerd Heusch
Editor of *Basic Research in Cardiology*

Re: **Diabetes Mellitus Abrogates Erythropoietin-Induced Cardioprotection against Ischemic-Reperfusion Injury by Alteration of the RISK/GSK-3 β Signalling**

Dear Dr Heusch,

We would like you to consider our manuscript entitled: **“Diabetes Mellitus Abrogates Erythropoietin-Induced Cardioprotection against Ischemic-Reperfusion Injury by Alteration of the RISK/GSK-3 β Signalling”**

Urgent restoration of coronary blood flow to the ischemic area is the most effective strategy for reducing myocardial infarct size and improving outcomes. Paradoxically, reperfusion itself may induce myocardial damage, termed reperfusion injury. New cardioprotective strategies, aimed at limiting myocardial infarct size, are required to attenuate reperfusion injury and to improve clinical outcomes.

Since the discovery of erythropoietin (EPO) receptors in cardiomyocytes, several studies have demonstrated EPO's cardioprotective effects when administered at the time of myocardial reperfusion through reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway activation. However, pharmacological agents or ischemic preconditioning, known for their ability to decrease reperfusion injury through RISK, appear to be less effective in diabetes. Furthermore, insulin resistance syndrome has been associated with alterations of RISK. In this context, it is uncertain whether EPO, administered at the time of reperfusion, is an effective acute therapeutic tool for reducing myocardial infarction extent in patients suffering from diabetes or insulin resistance.

The present study suggests that EPO-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is abrogated in Streptozotocin-induced diabetic rat hearts, with altered components of the RISK signalling pathway that inhibit GSK-3 β . We note that direct inhibition of GSK-3 β may represent an alternative therapeutic option to reduce infarct size in diabetes. On the other hand, the cardioprotective effect of EPO was maintained in our model of insulin resistance syndrome.

In addition we would like to state that the manuscript, or part of it, has neither been published (except in the form of abstract) nor is currently under consideration for publication by any other journal. All authors have read and approved the manuscript, and they do not have any conflict of interest to disclose.

Sincerely,

Fabrice Prunier, MD, PhD

Diabetes Mellitus Abrogates Erythropoietin-Induced Cardioprotection against Ischemic-Reperfusion Injury by Alteration of the RISK/GSK-3 β Signalling

Nehmat Ghaboura^a, Sophie Tamareille^a, Pierre-Henri Ducluzeau^b, Anne Croué^c, Yves Tourmen^d, Daniel Henrion^e, Alain Furber^{a,f}, and Fabrice Prunier^{a,f,*}

^a UPRES EA 3860, Protection et Remodelage du Myocarde; Université d'Angers, Faculté de Médecine, Angers, France

^bINSERM U694; Université d'Angers, Faculté de Médecine, Angers, France

^c CHU d'Angers, Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Angers, France

^d CHU d'Angers, Laboratoire de Biochimie, Angers, France

^e INSERM U771; CNRS UMR 6214; Université d'Angers, Faculté de Médecine, Angers, France

^f CHU d'Angers, Service de Cardiologie, Angers, France

***Corresponding author:**

Fabrice Prunier, MD, PhD

Protection et Remodelage du Myocarde

UPRES EA 3860

Faculté de Médecine

Rue Haute de Reculée

FR-49045 Angers Cedex 1

France

Phone: +33 241 355 147

Fax: +33 241 354 004

Email address: FaPrunier@chu-angers.fr

Abstract

Recent studies reported cardioprotective effects of erythropoietin (EPO) against ischemia-reperfusion (I/R) injury through activation of the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway. As RISK has been reported to be impaired in diabetes and insulin resistance syndrome, we examined whether EPO-induced cardioprotection was maintained in rat models of type 1 diabetes and insulin resistance syndrome.

Isolated hearts were obtained from three rat cohorts: healthy controls, streptozotocin (STZ)-induced diabetes, and high-fat diet (HFD)-induced insulin resistance syndrome. All hearts underwent 25min ischemia and were assigned to receive either no intervention or a single dose of EPO at the onset of reperfusion.

In hearts from healthy controls, EPO decreased infarct size ($14.36\pm 0.60\%$ and $36.22\pm 4.20\%$ of left ventricle in EPO-treated and untreated hearts, respectively, $p<0.05$) and increased phosphorylated forms of Akt, ERK1/2, and their downstream target GSK-3 β . In hearts from STZ-induced diabetic rats, EPO did not decrease infarct size ($32.05\pm 2.38\%$ and $31.88\pm 1.87\%$ in EPO-treated and untreated diabetic rat hearts, respectively, NS) nor did it increase phosphorylation of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β . In contrast, in hearts from HFD-induced insulin resistance rats, EPO decreased infarct size ($18.66\pm 1.99\%$ and $34.62\pm 3.41\%$ in EPO-treated and untreated HFD rat hearts, respectively, $p<0.05$) and increased phosphorylation of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β . Administration of GSK-3 β inhibitor SB216763 was cardioprotective in diabetic rat hearts.

STZ-induced diabetes abolished EPO-induced cardioprotection against I/R injury through a disruption of upstream signalling of GSK-3 β . In conclusion, direct inhibition of GSK-3 β may provide an alternative strategy to protect diabetic hearts against I/R injury.

Keywords: Diabetes; erythropoietin; ischemia; cardioprotection; postconditioning.

INTRODUCTION

Acute myocardial infarction (MI) is a major cause of morbidity and mortality worldwide [26]. Urgent restoration of coronary blood flow to the ischemic area is the most effective strategy for reducing myocardial infarct size and improving outcomes. Paradoxically, reperfusion itself may induce myocardial damage, termed reperfusion injury [49]. Activation of the reperfusion injury salvage kinase pathway (RISK), including phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK), is a promising strategy aimed at further decreasing cardiac damage in acutely reperfused MI [11, 12]. The cardioprotection induced by the activation of RISK is believed to be mainly related to inhibition of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening at the onset of reperfusion [36]. The multifunctional protein glycogen synthase kinase (GSK-3 β) is essential for inhibition of mPTP opening. GSK-3 β is a pivotal convergence point of several cytoprotective pathways including PI3K and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) [13, 27]. Erythropoietin (EPO) is one of the many pharmacological treatments activating the RISK pathway [9, 10, 35, 44]. Since the discovery of EPO receptors in cardiomyocytes [47], several studies have demonstrated EPO's cardioprotective effects when administered at the time of myocardial reperfusion through RISK pathway activation [2, 3, 32, 39].

Since diabetic patients are at high risk for developing ischemic heart disease, they are increasingly undergoing urgent revascularization. However, pharmacological agents [8, 25] or ischemic preconditioning [17, 19, 43], known for their ability to decrease reperfusion injury through RISK, appear to be less effective in diabetes. Furthermore, insulin resistance syndrome has been associated with alterations in ERK1/2 and GSK-3 β phosphorylation [46]. In this context, it is uncertain whether EPO, administered at the time of reperfusion, is an effective acute therapeutic tool for reducing myocardial infarction extent in patients suffering from diabetes or insulin resistance. Therefore, the aim of this study was to characterize EPO's cardioprotective ability in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats and in a rat model of high-fat diet (HFD)-induced insulin resistance.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animal model

The rats were handled in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23,

revised in 1996). Wistar rats, 10 weeks old, weighing ~ 200-250g, were randomly assigned to one of the following cohorts: 1) healthy adult rats receiving standard rat feed and tap water for 4 weeks; 2) diabetic rats in which diabetes was induced by a single intraperitoneal streptozotocin (STZ, 65mg/kg) injection, diluted in normal saline. One week following STZ injection, only rats with fasting blood glucose levels >120mg/dL were included in the study. Diabetic rats received unlimited standard feed and tap water for 4 weeks. They were not given insulin or antihyperglycemic agents; 3) high-fat diet rats (HFD) receiving unlimited tap water and a high-saturated-fat diet consisting of 35% fat, 35% carbohydrates, and 22% protein, for 4 weeks. It was assumed that this regimen would increase plasma insulin levels and induce insulin resistance [6].

Blood pressure assessment

In a subset of animals, blood pressure was measured in conscious rats by a tail-cuff device connected to a computerized system LE 5002[®] (BIOSEB, Chaville, France). One week before heart isolation, rats' blood pressure was measured in order for them to become accustomed to the procedure. The day before heart isolation, 10 blood pressure measurements were obtained and averaged for each selected rat.

Isolated heart protocol

Four weeks after inclusion, rat hearts were isolated and perfused, as previously described [39]. Briefly, rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60mg/kg), and heparin (1500IU/kg) was administered intravenously. Blood samples were collected from the abdominal aorta. Hearts were rapidly excised and immediately mounted on a Langendorff-perfusion apparatus (EMKA Technologies, Paris, France). The hearts were perfused with a modified Krebs-Henseleit buffer containing (in mM): NaCl 118, KCl 5.6, MgCl₂ 1.2, Na₂HPO₄ 1.2, NaHCO₃ 20, Glucose 12, and CaCl₂ 2.4, pH 7.4, saturated with 95% O₂/5% CO₂ at 37°C [39]. Perfusion was maintained at a constant pressure of 75mmHg.

All hearts were subjected to 20min stabilisation, followed by 25min global ischemia and 30min reperfusion [39], and then assigned to one of the following groups: 1) healthy control, no-treatment (Ctrl, n=7); 2) STZ-induced diabetes, no-treatment (Diab, n=6); 3) HFD-induced insulin resistance, no-treatment (HFD, n=6); 4) healthy receiving EPO (Ctrl-EPO, n=7); 5) STZ-induced diabetes receiving EPO (Diab-EPO, n=7); 6) HFD-induced insulin resistance receiving EPO (HFD-EPO, n=6). In all groups receiving EPO, a single dose of darbepoetin alfa (1000 IU/Kg donor body weight) was injected as a bolus into the perfusate at the onset of

reperfusion, as previously described [14, 39]. To examine the cardioprotective role of GSK-3 β phosphorylation in diabetic rat hearts, we used the GSK-3 β inhibitor, SB216763, in two more groups: healthy receiving SB216763 (Ctrl-SB21, n=6) and STZ-induced diabetes receiving SB216763 (Diab-SB21, n=6). SB216763 was added to the perfusate at a concentration of 3 μ M, given 10min prior to ischemia and continued throughout the reperfusion period [28, 42]. For infarct size assessment, five hearts in each group underwent the same protocol with 2h of reperfusion instead of 30min.

One more STZ-induced diabetic group receiving a high dose of darbepoetin alfa (5000 IU/kg donor body weight; Diab-EPO5000, n=6) [2, 22] at the onset of reperfusion was added in order to investigate whether type 1 diabetic rat hearts required higher EPO doses to be protected. Hearts in this group underwent 2h of reperfusion prior to infarct size measurement.

Assessment of biochemical parameters

Blood was collected from the abdominal aorta immediately before isolated heart preparation, and serum levels of insulin, leptin, and triglycerides were measured after 12 hours of fasting using radioimmuno assay kits for insulin and leptin (Rat Insulin ELISA Kit and Rat Leptin ELISA kit, Linco Research, USA) and enzymatic colorimetric assay for triglycerides (Roche Modular System, Roche Diagnostics, France). Fasting blood glucose levels were assessed 4 weeks after inclusion in all groups using Medisense Optium Xceed device (ABBOTT, Rungis, France).

Hemodynamic parameters

A fluid-filled latex balloon connected to a pressure transducer (EMKA Technologies, Paris, France) was inserted into the left ventricle (LV) of all isolated hearts and inflated to an initial LV end-diastolic pressure (LVEDP) of 8 to 10 mmHg. The parameters of cardiac function were continuously monitored and simultaneously recorded using IOX 1.593 software (EMKA Technologies, Paris, France). Heart rate, left ventricular systolic pressure (LVSP), LVEDP, and maximal (dP/dt_{max}) and minimal (dP/dt_{min}) values of the first derivative of LV pressure were measured throughout 30min of reperfusion. Left ventricular developed pressure (LVDP) was calculated as the difference between LVSP and LVEDP.

Infarct size measurement

After 2 hours of reperfusion, hearts were taken, and left ventricles were sectioned from apex to base into five to six 1mm sections by using a coronal heart slicer matrix (Braintree

Scientific Inc, USA) [30, 37]. Sections were incubated in 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma-Aldrich) in phosphate buffer solution, pH 7.4, at 37°C for 10min and then fixed in 10% formalin. For each section, the area of necrosis (AN) was quantified using planimetry Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) and expressed as a percentage of total LV area.

Determination of myocardial apoptosis

Detection of apoptotic cells in five hearts from each group was carried out, as previously described [39], using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL) method. After infarct size assessment, LV tissues were fixed in formalin and then stored at 4°C. The tissues were then embedded in paraffin and cut into 5µm thick sections. The sections were stained using *in situ* DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, the sections were deparaffinized and rehydrated using xylene and graded alcohol series. After digestion in proteinase K (20 µg/mL) for 20min, each section was incubated with a TUNEL reaction mixture in a humidified chamber at 37°C for 60min, 2xSSC for 15min, 0.3% hydrogen peroxide for 5min, and finally with streptavidin for 30min, then stained with DAB/H₂O₂ for 10min and counterstained with hematoxylin for 2min. The sections were washed in tap water, and then dehydrated, clarified, and mounted. Staining was viewed using an Olympus BX40 microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, USA). Two sections from each myocardial sample were randomly selected, and ten microscopic fields per section were evaluated by two independent blind observers. In each field, nuclei were counted, and the percentage of apoptotic nuclei stained dark brown (TUNEL-positive nuclei) was calculated.

Western blot analysis

For analysis of Akt, ERK1/2, and GSK-3β phosphorylation, hearts (n=6/group) were collected at the end of 30min of reperfusion, and the LV was freeze-clamped in liquid nitrogen before being stored at -80°C. Approximately 200 mg of powdered ventricular tissue was used for protein extraction. Frozen myocardial tissue samples were homogenized on ice in 1ml ice-cold lysis buffer then centrifuged, and the resulting supernatant was collected. Protein concentration was determined using Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to manufacturer instructions. Aliquots of the supernatant containing equal amounts of proteins (40µg) were loaded, electrophoresed on SDS-PAGE gel, and transferred to nitrocellulose membrane. The phosphorylation state of Akt (phospho-Akt, Ser⁴⁷³), ERK1/2

(phospho-ERK1/2), and GSK-3 β (phospho-GSK-3 β , Ser⁹), and total levels of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β were analyzed as previously described [39] using antibodies obtained from Cell Signaling Technology. The band densities were determined semi-quantitatively using a lumino-image analyzer, LAS-3000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Drugs

Darbepoetin alfa (Aranesp[®]) was purchased from Amgen, Inc. The darbepoetin alfa dose of 5 μ g/kg donor body weight is approximately equivalent to 1000 IU/kg recombinant EPO [30]. Streptozotocin and the GSK-3 β inhibitor SB216763 were purchased from Sigma-Aldrich. Streptozotocin was dissolved in normal saline, and SB216763 was dissolved in DMSO and diluted in a buffer so that the vehicle constituted less than 0.02% of the total volume. Sodium pentobarbital was obtained from Ceva Santé Animal, and heparin (Heparin Choay[®]) from Sanofi-Aventis.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using StatView software version 5.0. Differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newman-Keuls post hoc test. For the Langendorff data, ANOVA for repeated measurements was used. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

A total of 115 rats were initially included in this experiment (35 healthy rats, 58 rats received STZ-injection and 22 were exposed to HFD). Sixteen rats were excluded from the diabetic group as fasting blood glucose was lower than 120mg/dL, 7 days after STZ-injection, and two rats died the week following STZ-injection.

Four weeks after inclusion, the HFD group showed a significant increase in body weight, fasting plasma insulin, triglycerides, and leptin levels as compared to the healthy and diabetic groups (Table 1). Fasting blood glucose was significantly higher in the diabetic group compared to the healthy and HFD groups. Systolic blood pressure was similar in all groups 4 weeks after inclusion (Table 1).

EPO-induced cardioprotection was maintained in HFD rats but not in diabetic rats

Hemodynamic data

There was no significant difference in heart rate at baseline and throughout the reperfusion period when comparing EPO-treated to untreated groups with the same condition (healthy, Diab, and HFD) (Table 2). However, significant differences in baseline heart rate were observed in Diab and HFD groups compared to Ctrl group. A significant decrease in heart rate was also noted between Diab and Ctrl groups during the reperfusion period (Table 2). No differences in LVDP, dP/dt_{max} , or dP/dt_{min} before ischemia were found between the Ctrl-EPO, Diab-EPO, and HFD-EPO groups and their respective untreated groups (Fig. 1, Fig. 2, and Table 2). LVDP, dP/dt_{max} , and dP/dt_{min} were all impaired after 25min ischemia in the Ctrl, Diab and HFD groups. EPO (1000 IU/kg) significantly improved LVDP, dP/dt_{max} , and dP/dt_{min} during reperfusion in both healthy and HFD groups compared to untreated groups with the same condition. Moreover, there was no difference in these parameters between the Ctrl-EPO and HFD-EPO groups throughout the reperfusion period (Fig. 1 and Table 2). In contrast, EPO (1000 IU/kg) failed to improve LVDP, dP/dt_{max} , and dP/dt_{min} in the diabetic group (Fig. 2 and Table 2).

Infarct size

Infarct size did not significantly differ between Diab, HFD, and Ctrl groups (% AN/LV area = $31.88 \pm 1.87\%$, $34.62 \pm 3.41\%$, and $36.22 \pm 4.20\%$, respectively, all NS) (Fig. 3). EPO (1000 IU/kg) significantly reduced infarct size in the healthy group ($14.36 \pm 0.6\%$ in Ctrl-EPO vs. $36.22 \pm 4.20\%$ in Ctrl group, $p < 0.05$) and HFD group ($18.66 \pm 1.99\%$ in HFD-EPO vs. $34.62 \pm 3.41\%$ in HFD group, $p < 0.05$). However, EPO (1000 IU/kg) failed to decrease infarct size in the diabetic group ($32.05 \pm 2.38\%$ in Diab-EPO vs. $31.88 \pm 1.87\%$ in Diab, NS) (Fig. 3).

Evaluation of apoptosis

As shown in Figure 4, EPO (1000 IU/kg) significantly reduced the number of TUNEL-positive nuclei expressed as a percent of total nuclei in the healthy group ($12.51 \pm 1.98\%$ in Ctrl-EPO vs. $23.13 \pm 2.48\%$ in Ctrl group, $p < 0.05$) and HFD group ($12.21 \pm 1.17\%$ in HFD-EPO vs. $22.62 \pm 2.26\%$ in HFD group, $p < 0.05$). Again, EPO (1000 IU/kg) failed to decrease the number of TUNEL-positive nuclei in the diabetic group ($21.64 \pm 3.69\%$ in Diab-EPO vs. $20.99 \pm 1.41\%$ in Diab group, NS).

Altered RISK pathway involved in the impairment of EPO-induced cardioprotection in diabetic rats

In order to explain the abolished cardioprotective effect of EPO in diabetic rat hearts, we evaluated the phosphorylation levels of survival kinases Akt and ERK1/2, and the downstream target GSK-3 β in isolated perfused hearts following 30min of reperfusion.

PI3K/Akt pathway

There was no significant difference in total Akt levels in all study groups. Therefore, phospho-Akt (P-Akt) levels were expressed as densitometric levels normalized by total protein levels. No difference in phosphorylation levels of Akt was observed between Ctrl, Diab, and HFD groups after 30min of reperfusion (P-Akt/Akt: 0.61 ± 0.04 , 0.65 ± 0.11 , and 0.59 ± 0.03 , respectively, all NS) (Fig. 5a). EPO (1000 IU/kg) increased the phosphorylation levels of Akt in the healthy group (1.11 ± 0.17 in Ctrl-EPO vs. 0.61 ± 0.04 in Ctrl group, $p<0.05$) and HFD group (0.99 ± 0.05 in HFD-EPO vs. 0.59 ± 0.03 in HFD group, $p<0.05$). On the contrary, EPO (1000 IU/kg) did not increase P-Akt/Akt ratio in the diabetic group (0.71 ± 0.05 in Diab-EPO group vs. 0.65 ± 0.11 in Diab group, NS) (Fig. 5a).

MAPK pathway

Immunoblots of total ERK1 and total ERK2 displayed no differences between groups. Following 30min of reperfusion, no differences were observed in the phosphorylation forms of ERK1/2 between Ctrl, Diab, and HFD groups (P-ERK1/2/ERK1/2: 0.71 ± 0.09 , 0.74 ± 0.06 and 0.61 ± 0.1 , respectively, all NS) (Fig. 5b). EPO (1000 IU/kg) significantly increased the phosphorylated form of ERK1/2 in the healthy group (1.33 ± 0.15 in Ctrl-EPO vs. 0.71 ± 0.09 in Ctrl group, $p<0.05$) and HFD group (1.27 ± 0.20 in HFD-EPO vs. 0.61 ± 0.10 in HFD group, $p<0.05$); this effect was significantly abrogated in the diabetic groups (0.81 ± 0.06 in Diab-EPO group vs. 0.74 ± 0.06 in Diab group, NS) (Fig. 5b).

Analysis of GSK-3 β phosphorylation

No significant differences between groups were observed for total GSK-3 β . Immunoblots of phospho-GSK-3 β revealed that EPO (1000 IU/kg)-induced phosphorylation observed in the healthy group was abrogated in the diabetic group (P-GSK-3 β /GSK-3 β : 1.30 ± 0.09 in Ctrl-EPO vs. 0.69 ± 0.06 in Ctrl group, $p<0.05$ and 0.53 ± 0.08 in Diab-EPO group vs. 0.54 ± 0.08 in Diab group, NS), following 30min of reperfusion (Fig. 5c). However, the significant elevation of phosphorylation levels of GSK-3 β in response to EPO (1000 IU/kg) was maintained in the HFD group (1.49 ± 0.07 in HFD-EPO vs. 0.66 ± 0.04 in HFD group, $p<0.05$) (Fig. 5c).

GSK3- β inhibitor was cardioprotective in diabetic hearts

To examine whether the significant inhibition of EPO-induced GSK-3 β phosphorylation in diabetic rat hearts was due to the significantly abrogated phosphorylation of Akt and ERK1/2, the GSK-3 β inhibitor SB216763 was used in the healthy and diabetic groups.

While EPO did not improve the hemodynamic parameters of diabetic rat hearts, the inhibition of GSK-3 β by SB216763 significantly improved LVDP, dP/dt_{max} , and dP/dt_{min} in the diabetic group as well as in the healthy group during the reperfusion period (Fig. 6a, 6b and Table 2).

Interestingly, SB216763 reduced infarct size in both healthy ($18.87 \pm 2.26\%$ in Ctrl-SB21 vs. $36.22 \pm 4.20\%$ in Ctrl, $p < 0.05$) and diabetic groups ($20.25 \pm 3.88\%$ in Diab-SB21 vs. $31.88 \pm 1.87\%$ in Diab, $p < 0.05$) (Fig. 6c and 6d).

Moreover, SB216763 treatment significantly reduced the number of TUNEL-positive nuclei in both healthy ($11.84 \pm 0.52\%$ in Ctrl-SB21 vs. $23.13 \pm 2.48\%$ in Ctrl, $p < 0.05$) and diabetic groups ($11.95 \pm 1.06\%$ in Diab-SB21 vs. $20.99 \pm 1.41\%$ in Diab, $p < 0.05$) (Fig. 7).

The lack of EPO-induced cardioprotection in diabetic rats was not dose-related

In order to examine whether the lack of EPO-induced cardioprotection in diabetes was related to the decreased sensibility to EPO, a further group was added, receiving a higher EPO dose. As shown in Figure 8, 5000 IU/kg of EPO injected at the onset of reperfusion failed to improve LVDP during the reperfusion period. Infarct size was similar in untreated diabetic hearts, and diabetic hearts receiving 1000 or 5000 IU/kg of EPO.

DISCUSSION

The present data suggests that EPO-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion (I/R) injury is abrogated in STZ-induced diabetic rat hearts, with altered components of the RISK signalling pathway that inhibit GSK-3 β . We note that direct inhibition of GSK-3 β may represent an alternative therapeutic option to reduce infarct size in diabetes. On the other hand, the cardioprotective effect of EPO was maintained in our model of insulin resistance syndrome.

Previous studies have shown that ischemic preconditioning [17, 43], ischemic postconditioning [7], and several pharmacological agents known to activate the RISK signalling pathway (morphine [8], isoflurane [40], diazoxide [16], and remifentanyl [18]) failed to induce cardioprotection in STZ-induced diabetic rats or mice. To the best of our

knowledge, EPO-induced cardioprotection has never been tested in type 1 diabetes models. In our study, we observed that increased phosphorylation of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β in response to EPO was abolished in a STZ-induced diabetic model. Furthermore, increasing the dose of EPO did not restore the cardioprotective effects. These findings are in line with previous studies using increased doses of pharmacological cardioprotective agents in order to overcome the decreased protection caused by hyperglycemia. Kehl *et al.* have demonstrated that severe hyperglycemia (~ 600mg/dL) prevented the reduction of infarct size using both low and high alveolar concentrations of isoflurane [15]. In addition, Kersten *et al.* have shown that profound but not moderate hyperglycemia blocked the cardioprotective effects of high-dose diazoxide [16]. Raphael *et al.* demonstrated that hyperglycemia inhibited isoflurane-induced postconditioning by altering PI3K/Akt and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) signalling [33]. Furthermore, Amour *et al.* reported that eNOS-regulated agents which played central role in cardioprotection modulated by volatile anesthetics were dysregulated by hyperglycemia [1]. In Goto-kakizaki rats characterized by moderately elevated blood glucose levels (~300mg/dL), Tsang *et al.* reported that increase of preconditioning cycle numbers was able to reach the threshold for cardioprotection and critical levels of Akt phosphorylation [45]. Therefore, the severity of hyperglycemia appears to play a determining role in cardioprotection impairment to reperfusion injury. Restoration of cardioprotection with higher doses of pharmacologic agents or increased number of preconditioning stimuli may be possible in moderate (~300mg/dL) but not in severe hyperglycemia (~600mg/dL). Przyklenk *et al.* recently reported that therapeutic control of blood glucose re-established the protective effect of ischemic postconditioning in a mouse model of diabetes [31]. Severe hyperglycemia observed in our STZ-induced diabetic rats may explain why EPO, even at high doses, failed to induce cardioprotection.

Our data reinforces the findings of Gross *et al.*, who demonstrated that diabetes abolished morphine-induced cardioprotection, while direct GSK-3 β inhibition with SB216763 significantly decreased infarct size in STZ-induced diabetic rats [8]. Importantly, they reported that STZ-induced diabetes altered multiple pathways upstream of GSK-3 β , including JAK/STAT, PI3K, and MAPK signalling pathways, which resulted in the abrogation of morphine-induced cardioprotection in diabetic rats [8]. In this context, Laviola *et al.* demonstrated that diabetes altered the specific proteins downstream of insulin signalling and reduced insulin's ability to phosphorylate and therefore inactivate GSK-3 β at Ser⁹ in diabetic rat hearts [21]. In a rat model of obese type 2 diabetes, Miki *et al.* reported that endoplasmic

reticulum stress was responsible for the absence of EPO induced-cardioprotection, by altering survival signalling pathways such as PI3K/Akt and ERK1/2, and the downstream target GSK-3 β [25]. In line with our results obtained in a type 1 diabetes model, direct GSK-3 β inhibition was cardioprotective in a type 2 diabetes model [25].

In the present study, EPO-induced cardioprotection was similar in healthy rats and the HFD-induced insulin resistance model. In the WOKW rat model mimicking a metabolic syndrome characterized by obesity, moderate hypertension, dyslipidemia, hyperinsulinemia, and impaired glucose tolerance, Wagner *et al.* reported that ischemic postconditioning was abolished, with a lack of ERK1/2 and GSK-3 β phosphorylation induction [46]. Two major differences from our HFD-model should be stressed. First, WOKW rats were studied following 18 weeks of insulin resistance, as compared to only 4 weeks of a high-fat diet regimen in our study. RISK pathway alterations may need time to occur. Secondly, *in vivo* model was used in the WOKW rats study, whereas isolated Langendorff-perfused hearts were used in our study.

Results from current scientific literature as to whether diabetes can protect the myocardium against infarction are conflicting. Although some studies have reported myocardium tolerance to ischemia [23, 34], others have observed deleterious [29] or negligible effects. In line with these findings, we observed that diabetes had no effect on functional recovery and infarct size following ischemia. The differences in cardioprotection may be due to the duration of diabetes, dose of STZ used, serum glucose before initiation of ischemia, and in isolated heart experiments, glucose concentrations in the perfusion buffer [8]. Regarding insulin resistance syndrome, previous studies have demonstrated that insulin resistant animals were more sensitive to I/R injury [24, 38]. In the present study, insulin resistance syndrome had no effect on I/R injury. Similarly, Thim *et al.* [41] demonstrated that infarct size induced by I/R was unaltered in metabolic syndrome rats. The conflicting data published in medical literature may be accounted for by the varying models of insulin resistance used.

Our study has some limitations, and the results must be interpreted taking this into account. The baseline decreases in heart rates observed in the diabetic and HFD groups compared to the healthy group may have played a role in cardioprotective response to EPO. Diabetic hearts have been shown to be characterized by a decreased heart rates due to

abnormal β -adrenoreceptor density [5], alteration in catecholamine turnover and metabolism, [20] and alterations of intracellular signalling pathways [4]. Previous studies also reported decreased baseline heart rates in case of insulin resistance 2 weeks after HFD initiation [48]. However, in the present study, infarct size was equivalent in untreated diabetic, insulin resistant, and healthy hearts despite the significantly decreased heart rate in the diabetic and HFD groups. In a similar STZ-induced diabetic model, baseline decreased heart rates in case of diabetes did not affect infarct size [8]. Accordingly, diabetic and insulin resistant rat hearts were not paced in our experiments. Indeed, EPO-induced cardioprotection was found in insulin resistant rat hearts in spite of the significantly decreased baseline heart rates. In summary, this suggests dissociation between baseline heart rate and cardioprotective response to EPO. As our findings were obtained from 2 rat models with short-term exposure to diabetes or insulin resistance, extrapolation to humans requires further studies. Subgroup analyses from ongoing clinical trials with EPO and postconditioning strategies are likely to provide further answers to these questions in the near future.

In conclusion, we report that EPO-induced cardioprotection against I/R injury was abolished in presence of STZ-induced diabetes but not in our model of insulin resistance. STZ-induced diabetes abolished the ability of EPO to phosphorylate components of RISK pathway and consequently, the phosphorylation of the downstream target GSK-3 β . This data suggests that direct inhibition of GSK-3 β at the time of reperfusion may be an alternative therapeutic approach to prevent I/R injury in the case of diabetes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pierre Legras and Jerome Roux from the animal facilities for taking care of the animals, and Robert Filmon (Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques) for his technical assistance. S. Tamareille and N. Ghaboura were supported by a fellowship from the *Conseil Général du Maine et Loire*.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Amour J, Brzezinska AK, Jager Z, Sullivan C, Weihrauch D, Du J, Vladic N, Shi Y, Warltier DC, Pratt PF, Jr., Kersten JR (2005) Hyperglycemia Adversely Modulates Endothelial Nitric Oxide Synthase during Anesthetic Preconditioning through Tetrahydrobiopterin- and Heat Shock Protein 90-mediated Mechanisms. *Anesthesiology*
2. Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM (2005) Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 100:397-403
3. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M (2003) Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4802-4806
4. Ceylan-Isik A, Hunkar T, Asan E, Kaymaz F, Ari N, Soylemezoglu T, Renda N, Soncul H, Bali M, Karasu C (2007) Cod liver oil supplementation improves cardiovascular and metabolic abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 59:1629-1641
5. Dincer UD, Bidasee KR, Guner S, Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM (2001) The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes* 50:455-461
6. Dumas JF, Simard G, Flamment M, Ducluzeau PH, Ritz P (2009) Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? *Diabetes Metab* 35:159-167
7. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 59:418-458
8. Gross ER, Hsu AK, Gross GJ (2007) Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta. *Diabetes* 56:127-136
9. Guillard C, Chretien S, Pelus AS, Porteu F, Muller O, Mayeux P, Duprez V (2003) Activation of the mitogen-activated protein kinases Erk1/2 by erythropoietin receptor via a G(i) protein beta gamma-subunit-initiated pathway. *J Biol Chem* 278:11050-11056

10. Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E (2005) Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *FASEB J* 19:1323-1325
11. Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM (2005) The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med* 15:69-75
12. Hausenloy DJ, Yellon DM (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61:448-460
13. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ (2004) Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* 113:1535-1549
14. Kaygisiz Z, Erkasap N, Yazihan N, Sayar K, Ataoglu H, Uyar R, Ikizler M (2006) Erythropoietin changes contractility, cAMP, and nitrite levels of isolated rat hearts. *J Physiol Sci* 56:247-251
15. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR (2002) Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology* 96:183-188
16. Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, Gross ER, Toller WG, Pagel PS, Warltier DC (2001) Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H1744-1750
17. Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC (2000) Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1218-1224
18. Kim HS, Cho JE, Hwang KC, Shim YH, Lee JH, Kwak YL Diabetes mellitus mitigates cardioprotective effects of remifentanyl preconditioning in ischemia-reperfused rat heart in association with anti-apoptotic pathways of survival. *Eur J Pharmacol* 628:132-139
19. Kristiansen SB, Lofgren B, Stottrup NB, Khatir D, Nielsen-Kudsk JE, Nielsen TT, Botker HE, Flyvbjerg A (2004) Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Diabetologia* 47:1716-1721

20. Latifpour J, McNeill JH (1984) Cardiac autonomic receptors: effect of long-term experimental diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 230:242-249
21. Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S, Weir GC, Giorgino R, Giorgino F (2001) Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes* 50:2709-2720
22. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2004) Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 44:473-479
23. Liu Y, Thornton JD, Cohen MV, Downey JM, Schaffer SW (1993) Streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes protects the heart from infarction. *Circulation* 88:1273-1278
24. Maddaford TG, Russell JC, Pierce GN (1997) Postischemic cardiac performance in the insulin-resistant JCR:LA-cp rat. *Am J Physiol* 273:H1187-1192
25. Miki T, Miura T, Hotta H, Tanno M, Yano T, Sato T, Terashima Y, Takada A, Ishikawa S, Shimamoto K (2009) ER stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-GSK-3 β -mediated suppression of mitochondrial permeability transition. *Diabetes*
26. Murray CJ, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1498-1504
27. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, Shimamoto K (2007) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3 β -mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol* 43:564-570
28. Park SS, Zhao H, Mueller RA, Xu Z (2006) Bradykinin prevents reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through glycogen synthase kinase 3 β . *J Mol Cell Cardiol* 40:708-716
29. Paulson DJ (1997) The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovasc Res* 34:104-112
30. Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ (2007) Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H522-529
31. Przyklenk K, Maynard M, Greiner DL, Whittaker P (2008) Abstract 1905: Restoration of Normoglycemia Re-Establishes the Infarct-Sparing Effect of Postconditioning in Diabetic Mice. *Circulation* 118:S_402-d-403

32. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA, Jr., Tweddell JS, Baker JE (2005) Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 100:187-197
33. Raphael J, Gozal Y, Navot N, Zuo Z Hyperglycemia inhibits anesthetic-induced postconditioning in the rabbit heart via modulation of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and endothelial nitric oxide synthase signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*
34. Ravingerova T, Stetka R, Volkovova K, Pancza D, Dzurba A, Ziegelhoffer A, Styk J (2000) Acute diabetes modulates response to ischemia in isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 210:143-151
35. Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 29:258-267
36. Shanmuganathan S, Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM (2005) Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H237-242
37. Sharma A, Singh M (2000) Possible mechanism of cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in isolated rat heart. *Pharmacol Res* 41:635-640
38. Sidell RJ, Cole MA, Draper NJ, Desrois M, Buckingham RE, Clarke K (2002) Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker Fatty rat heart. *Diabetes* 51:1110-1117
39. Tamareille S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F (2009) Myocardial reperfusion injury management: Erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
40. Tanaka K, Kehl F, Gu W, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR (2002) Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H2018-2023
41. Thim T, Bentzon JF, Kristiansen SB, Simonsen U, Andersen HL, Wassermann K, Falk E (2006) Size of myocardial infarction induced by ischaemia/reperfusion is unaltered in rats with metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 110:665-671
42. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E (2002) Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 90:377-379
43. Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK (1996) The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 31:526-536

44. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N (2003) Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 308:990-994
45. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM (2005) Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation. *Diabetes* 54:2360-2364
46. Wagner C, Kloeting I, Strasser RH, Weinbrenner C (2008) Cardioprotection by postconditioning is lost in WOKW rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta. *J Cardiovasc Pharmacol* 52:430-437
47. Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO (2004) Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 18:1031-1033
48. Wright JJ, Kim J, Buchanan J, Boudina S, Sena S, Bakirtzi K, Ilkun O, Theobald HA, Cooksey RC, Kandror KV, Abel ED (2009) Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. *Cardiovasc Res* 82:351-360
49. Yellon DM, Hausenloy DJ (2007) Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357:1121-1135

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 Left ventricular developed pressure (LVDP) (a) and dP/dt_{\max} (b) during stabilization (Stab) and reperfusion periods. EPO (1000 IU/kg) significantly improved LVDP and dP/dt_{\max} during reperfusion in isolated hearts from healthy rats (Ctrl-EPO: black square, n=12) and high-fat diet rats (HFD-EPO: white square, n=11) compared to non-treated hearts (Ctrl: black triangles, n=12 and HFD: white triangles, n=11, respectively). Isch, ischemia. Data is presented as mean \pm SEM. * p <0.05 compared to Ctrl; # p <0.05 compared to HFD

Fig. 2 Left ventricular developed pressure (LVDP) (a) and dP/dt_{\max} (b) during stabilization (Stab) and reperfusion periods. EPO (1000 IU/kg) significantly improved LVDP and dP/dt_{\max} during reperfusion in isolated hearts from healthy rats (Ctrl-EPO: black square, n=12) compared to non-treated hearts (Ctrl: black triangles, n=12). In contrast, EPO (1000 IU/kg) had no effect on LVDP and dP/dt_{\max} during reperfusion in isolated hearts from diabetic rats (Diab-EPO: white square, n=12) compared to non-treated hearts (Diab: white triangles, n=11). Isch, ischemia. Data is presented as mean \pm SEM. * p <0.05 Ctrl; # p <0.05 compared to Ctrl-EPO

Fig. 3 a Representative pictures of left ventricle sections after TTC staining in Ctrl, Diab, and HFD groups compared to the respective groups injected with 1000 IU/kg of EPO. b Area of necrosis (AN) expressed as a percentage of left ventricular (LV) area. Ctrl, control; EPO, erythropoietin; Diab, diabetic; HFD, high-fat diet. * p <0.05 compared to untreated rat hearts with the same condition (Ctrl; Diab; HFD). N=5 hearts in each group

Fig. 4 Effect of EPO (1000 IU/kg) on apoptosis after ischemia-reperfusion in healthy, diabetic, and HFD rat hearts. a healthy untreated hearts (Ctrl), b healthy erythropoietin (1000 IU/kg)-treated hearts (Ctrl-EPO), c diabetic untreated hearts (Diab), d diabetic EPO (1000IU/kg)-treated hearts (Diab-EPO), e high-fat diet untreated hearts (HFD), f high-fat diet EPO (1000 IU/kg)-treated hearts (HFD-EPO). Apoptotic cardiomyocyte nuclei appear as brown stains, whereas TUNEL-negative nuclei appear blue with hematoxylin. Heavy staining of numerous TUNEL-positive nuclei was observed in healthy, diabetic, and HFD untreated hearts. In addition, several TUNEL-positive nuclei were noted in diabetic EPO (1000 IU/kg)-treated hearts. In contrast, few TUNEL-positive nuclei were detected in healthy and HFD-EPO (1000 IU/kg)-treated hearts. g TUNEL-positive nuclei expressed as a percent of total

nuclei in tissue sections from each group. * $p < 0.05$ vs. untreated rat hearts with the same condition (Ctrl; Diab; HFD). N=5 hearts in each group

Fig. 5 Representative blots and relative densitometry values for Akt (a), ERK1/2 (b), and GSK-3 β (c) in healthy untreated hearts (Ctrl), healthy erythropoietin (1000 IU/kg)-treated hearts (Ctrl-EPO), diabetic untreated hearts (Diab), diabetic EPO (1000 IU/kg)-treated hearts (Diab-EPO), high-fat diet untreated hearts (HFD), and high-fat diet EPO (1000 IU/kg)-treated hearts (HFD-EPO). P, phospho. * $p < 0.05$ compared to untreated rat hearts with the same condition (Ctrl; Diab; HFD). N=6 in each group

Fig. 6 Left ventricular developed pressure (LVDP) (a) and dP/dt_{max} (b) during stabilization (Stab) and reperfusion periods. SB216763 significantly improved LVDP and dP/dt_{max} during reperfusion in isolated hearts from healthy rats (Ctrl-SB21: black square, n=11) and diabetic rats (Diab-SB21: white square, n=11) compared to non-treated hearts (Ctrl: black triangles, n=12 and Diab: white triangles, n=11, respectively). Isch, ischemia. Data is presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to Ctrl; # $p < 0.05$ compared to Diab. c Representative images of left ventricle sections after TTC staining. d Area of necrosis (AN) expressed as a percentage of left ventricular (LV) area. Ctrl, control; SB21, SB216763; Diab, diabetic. * $p < 0.05$ compared to untreated rat hearts with the same condition (Ctrl; Diab). N=5 hearts in each group

Fig. 7 Effect of SB216763 on apoptosis after myocardial infarction in healthy and diabetic rats. a healthy untreated hearts (Ctrl), b healthy SB216763-treated hearts (Ctrl-SB21), c diabetic untreated hearts (Diab), d diabetic SB21-treated hearts (Diab-SB21). Apoptotic cardiomyocyte nuclei appear as brown stains, whereas TUNEL-negative nuclei appear blue with hematoxylin. In both healthy and diabetic SB21-treated hearts, few TUNEL-positive nuclei were detected, while numerous TUNEL-positive nuclei were observed in untreated hearts. e TUNEL-positive nuclei expressed as a percentage of total nuclei in tissue sections from each group. * $p < 0.05$ vs. untreated rat hearts with the same condition (Ctrl; Diab). N=5 hearts in each group

Fig. 8 High EPO dose (5000 IU/kg) failed to improve LVDP (a) and reduce infarct size (b) in diabetic rat hearts. No differences were found between diabetic untreated hearts (Diab: black

square, n=11), diabetic 1000 IU/kg EPO-treated hearts (Diab-EPO: black triangles, n=12), and diabetic 5000 IU/kg EPO-treated hearts (Diab-EPO5000: white triangles, n=6)

Table 1 Characteristics in healthy, diabetic and high fat diet rats

	Healthy group (n)	Diabetic group (n)	High fat diet group (n)
Body weight (g)	229 ± 9 (35)	206 ± 4* (40)	268 ± 4*# (22)
Systolic pressure (mmHg)	127 ± 6 (12)	138 ± 4 (14)	130 ± 7 (13)
Fasting glucose (mg/dL)	99.43 ± 1.60 (35)	463.82 ± 20.88* (40)	104.54 ± 2.52# (22)
P-insulin (ng/mL)	1.54 ± 0.28 (17)	0.70 ± 0.13* (20)	3.34 ± 0.34*# (22)
P- triglycerides (mmol/L)	0.31 ± 0.04 (6)	0.58 ± 0.11 (9)	1.08 ± 0.15*# (18)
P-leptin (ng/mL)	1.08 ± 0.19 (17)	1.89 ± 0.59 (20)	8.69 ± 0.73*# (22)

P, plasma. * $p < 0.05$ compared to healthy group; # $p < 0.05$ compared to diabetic group

Table 2 Heart rate and dP/dt_{\min} data

HR	n	Baseline	5min R	10min R	15min R	20min R	25min R	30min R
Ctrl	12	243±17	219±28	207±22	212±29	237±29	216±29	215±29
Ctrl-EPO	12	224±12	234±23	183±21	194±20	188±26	186±22	181±18
Diab	11	119±9 [#]	109±14 [#]	108±15 [#]	94±12 [#]	101±11 [#]	97±12 [#]	94±11 [#]
Diab-EPO	12	117±14	102±20	98±18	78±16	79±18	77±18	70±16
HFD	11	172±12 [#]	178±10	173±10	168±15	162±18 [#]	158±17	156±15
HFD-EPO	11	178±11	153±18	143±10	151±9	142±11	142±11	144±11
Ctrl-SB21	11	221±8	201±12	190±11	187±13	185±12 [#]	187±15	181±14
Diab-SB21	11	118±7 [#]	115±6 [#]	106±7 [#]	113±4 [#]	110±6 [#]	110±9 [#]	101±7 [#]
dP/dt_{\min}								
Ctrl	12	-1539±108	-613±133	-599±100	-635±112	-614±143	-521±107	-513±127
Ctrl-EPO	12	-1745±119	-1165±138 ^{*#}	-1477±206 ^{*#}	-1526±165 ^{*#}	-1556±167 ^{*#}	-1539±196 ^{*#}	-1604±196 ^{*#}
Diab	11	-1218±203	-736±154	-850±218	-777±190	-684±168	-740±177	-592±151
Diab-EPO	12	-1143±163	-436±174	-434±143	-544±145	-501±197	-492±206	-667±250
HFD	11	-1822±152	-529±215	-783±351	-777±337	-745±319	-621±356	-477±356
HFD-EPO	11	-1751±176	-1275±231 [*]	-1321±250	-1268±236 [*]	-1350±209 [*]	-1329±160 [*]	-134±160 [*]
Ctrl-SB21	11	-1587±157	-1035±167	-1028±151	-1112±179 [*]	-1068±181 [*]	-1182±103 [*]	-1147±127 [*]
Diab-SB21	11	-1263±113	-1095±180	-914±205	-1297±179 ^{*#}	-1212±180 ^{*#}	-1263±269 [#]	-1231±275 [#]

Data are means ± SEM. HR, heart rate (bpm); dP/dt_{\min} , minimal value of the first derivative of left ventricular pressure (mmHg/sec); Ctrl, control; EPO, erythropoietin 1000 IU/kg; SB21, SB216763; Diab, diabetic; HFD, high fat diet; R, reperfusion. * $p < 0.05$ compared to untreated rat hearts with the same condition (Ctrl; Diab; HFD); # $p < 0.05$ compared to Ctrl

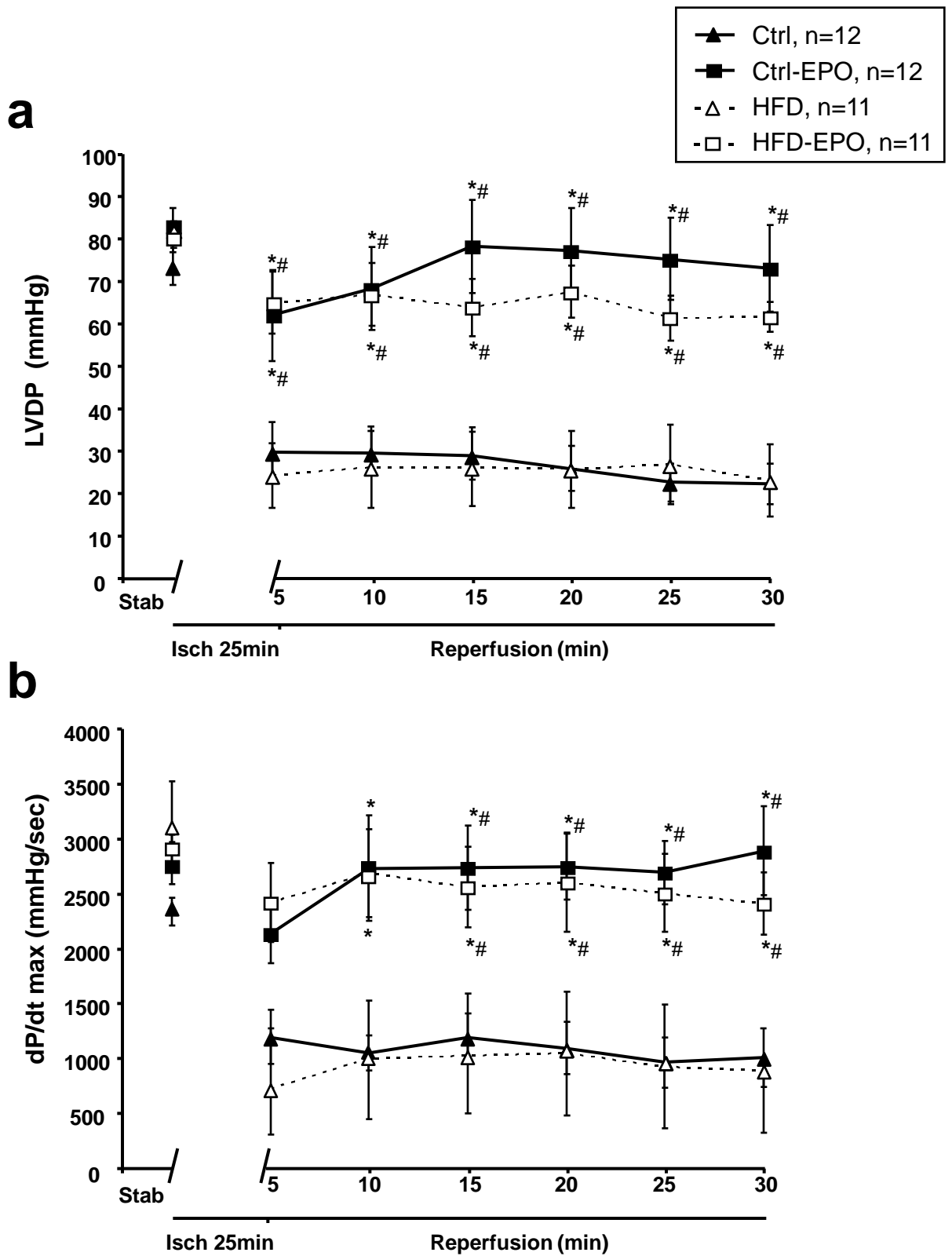


Fig. 1

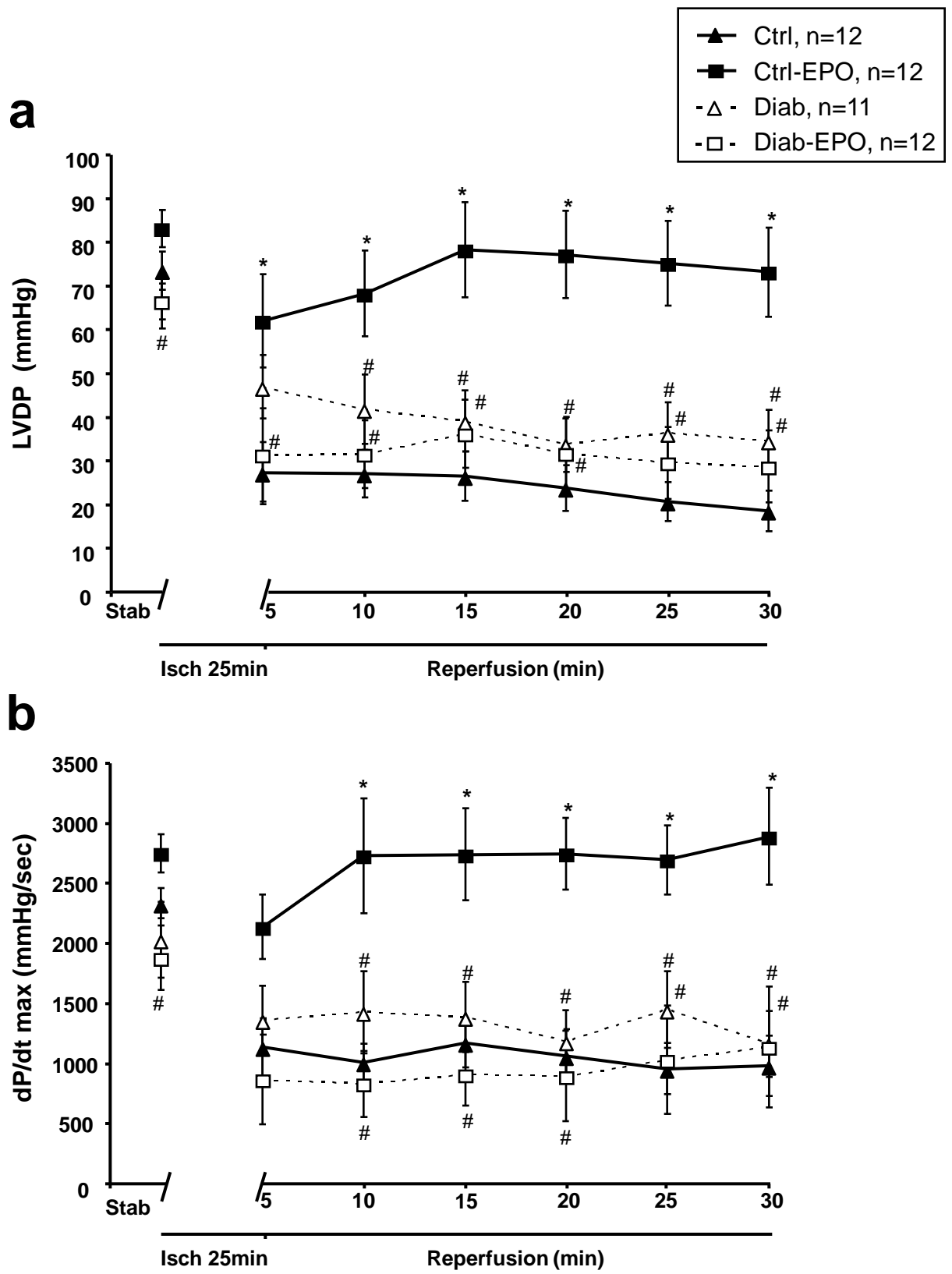
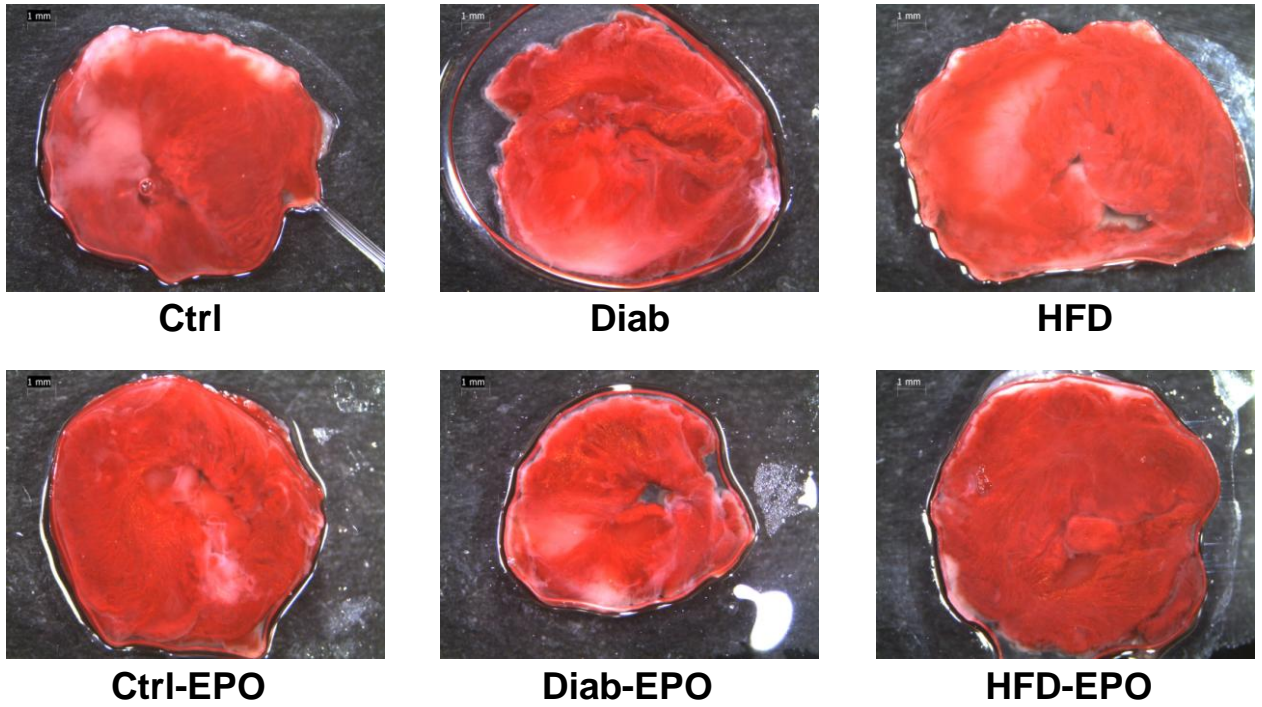


Fig. 2

a



b

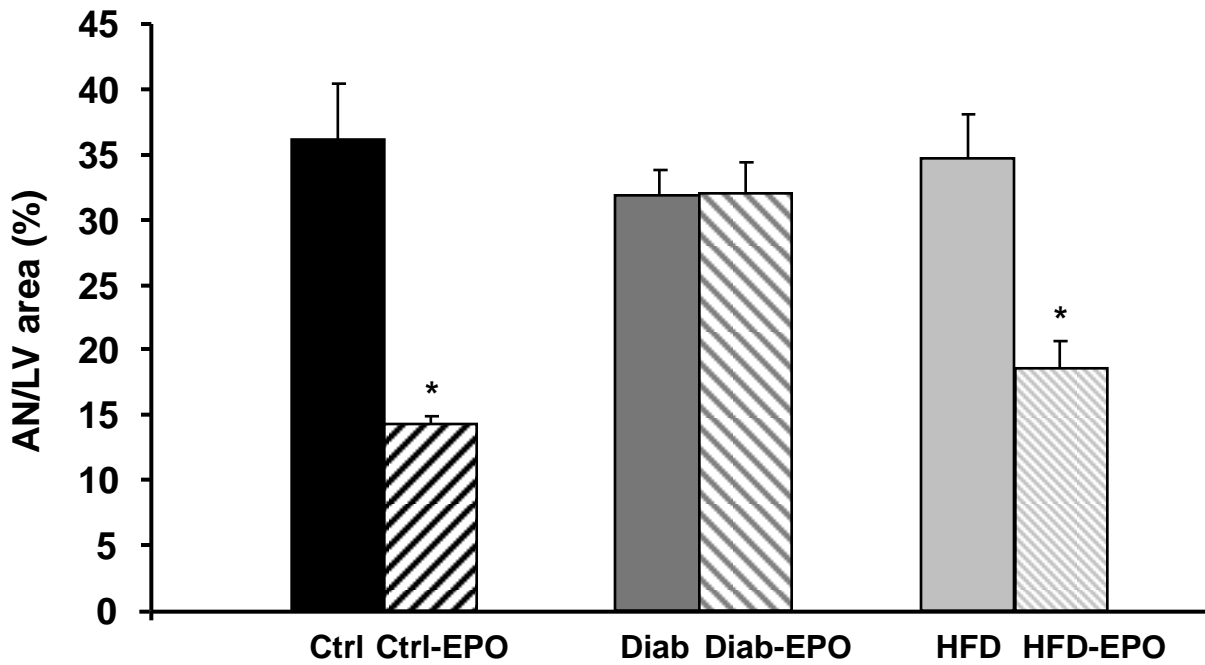


Fig. 3

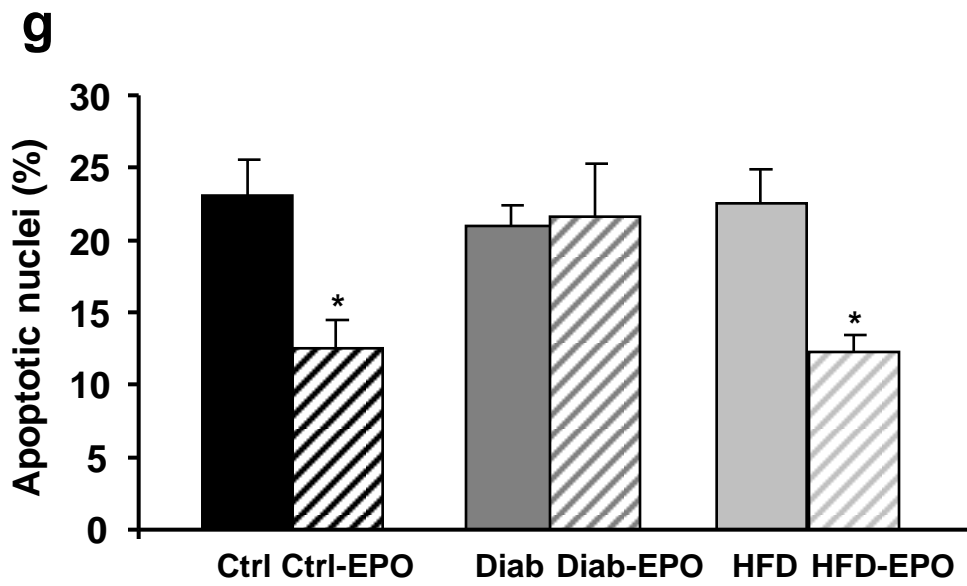
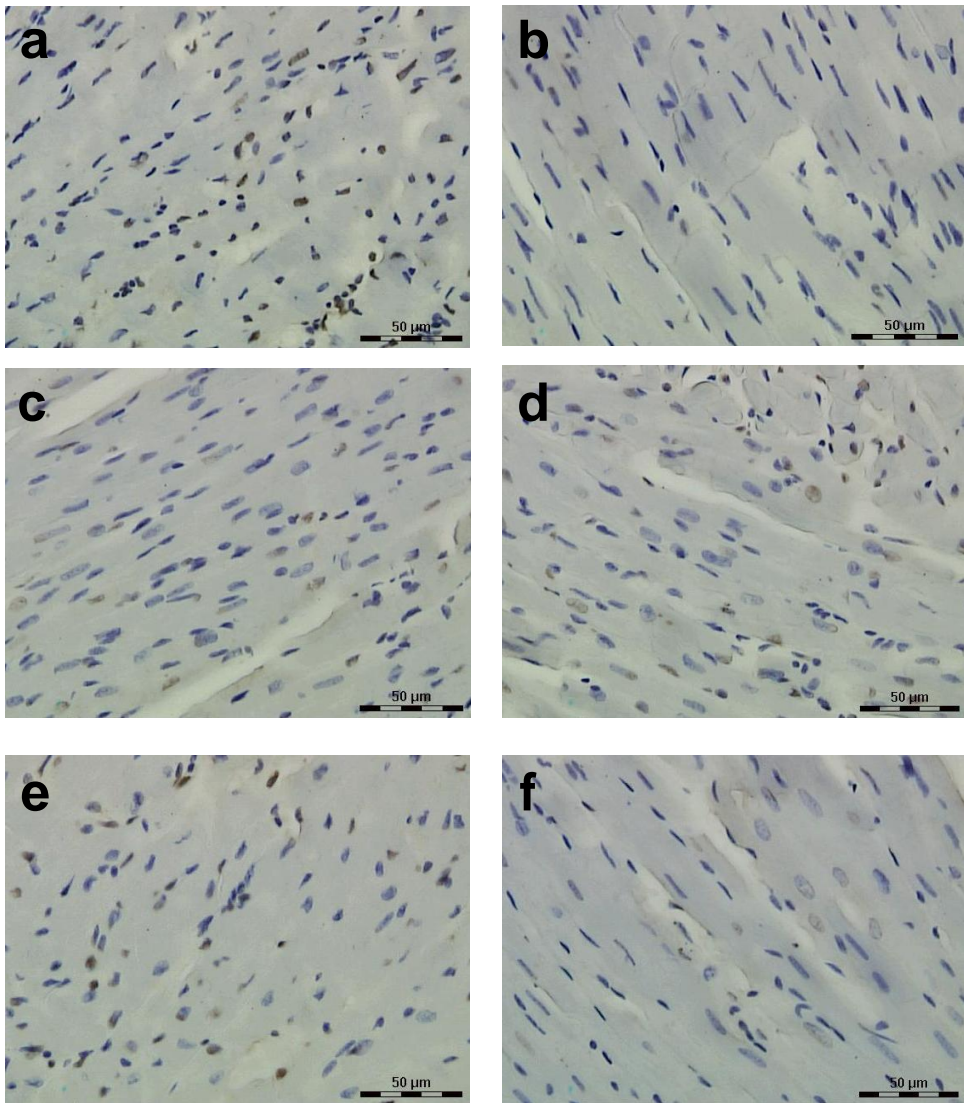


Fig. 4

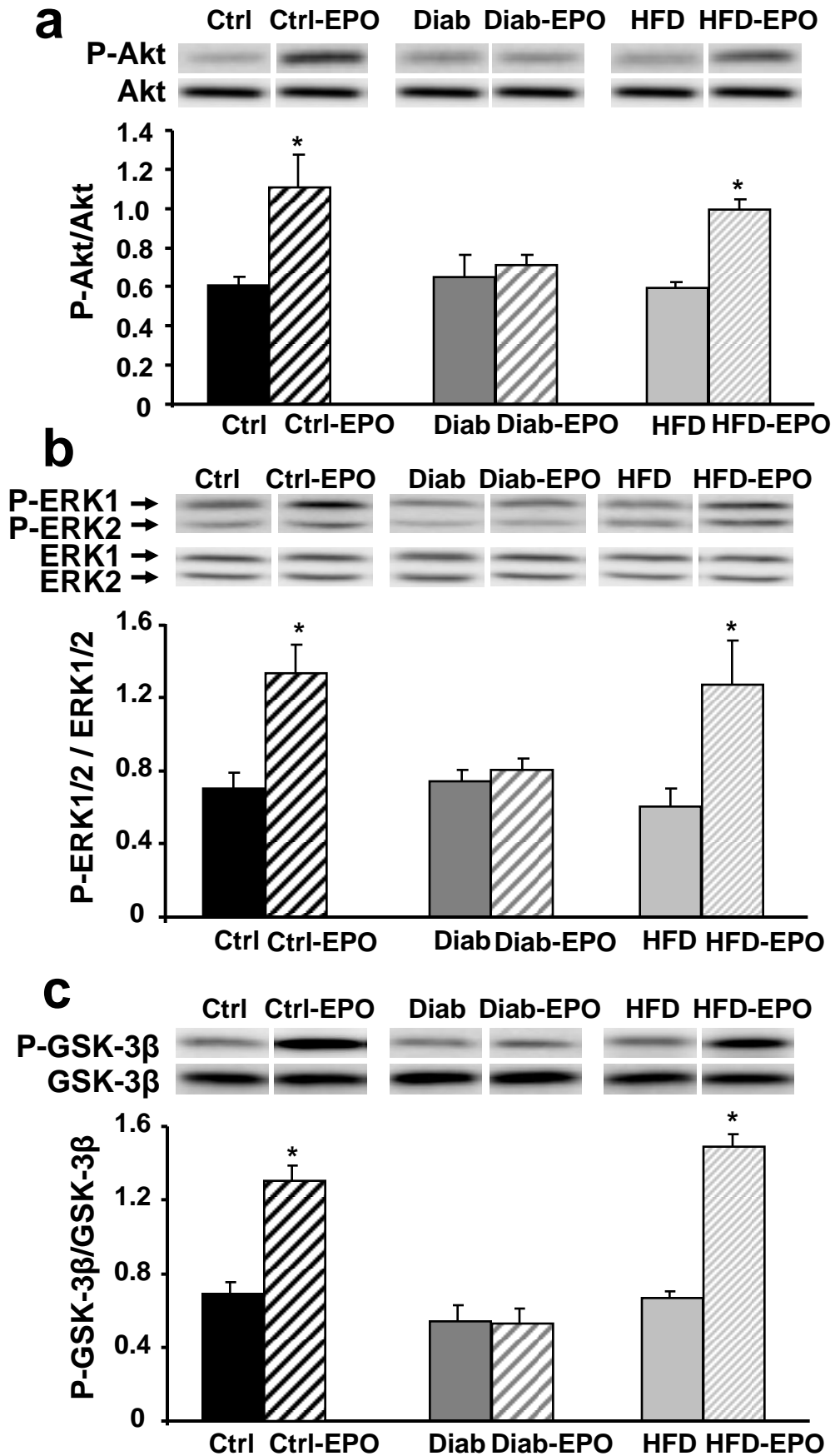


Fig. 5

Figure

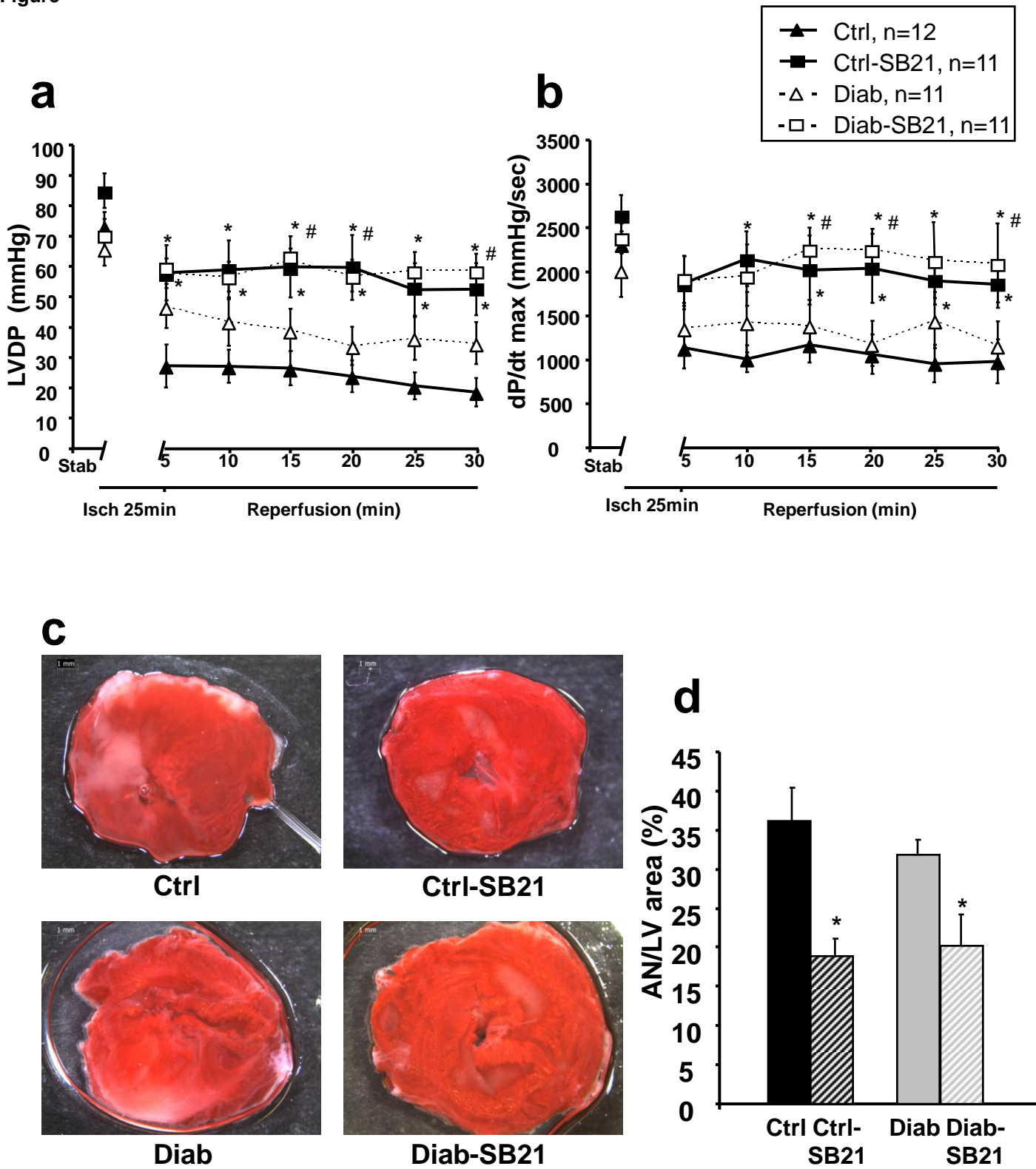


Fig. 6

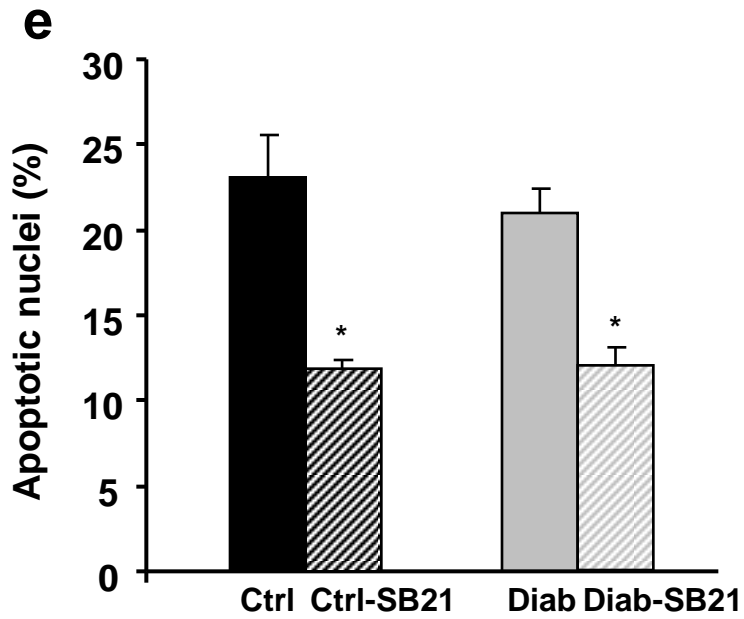
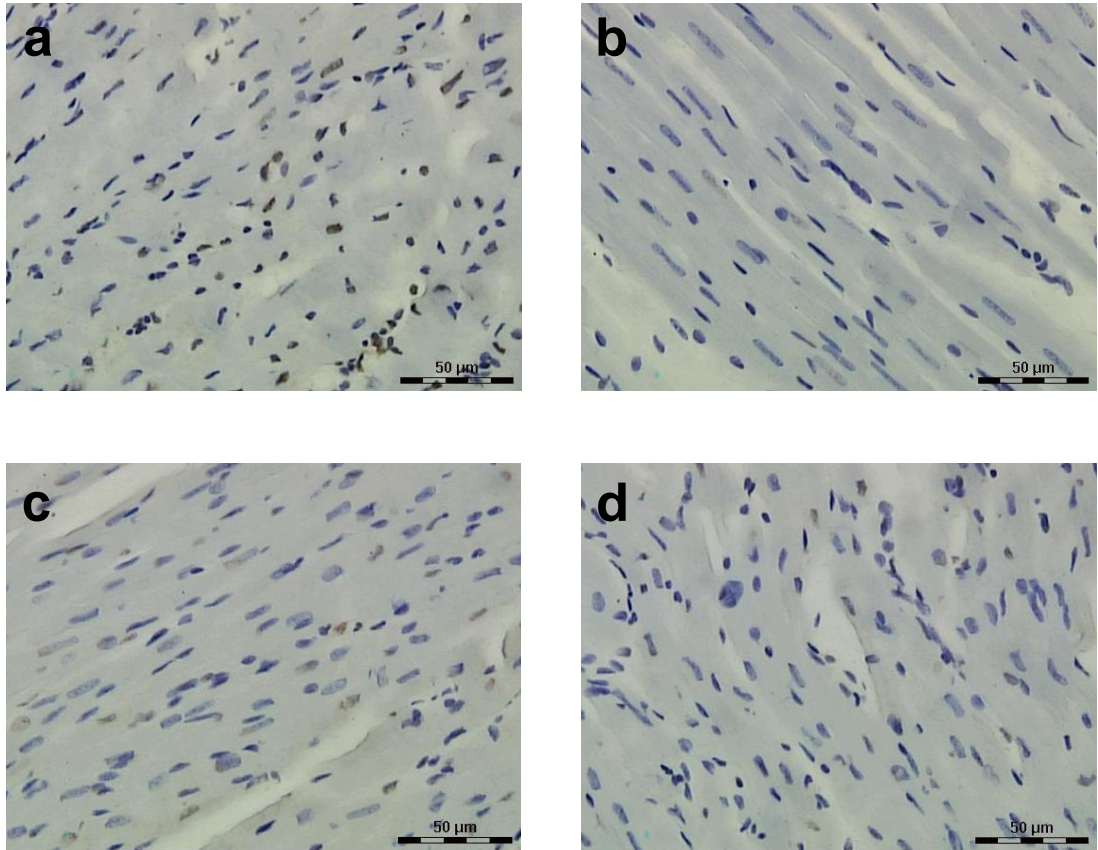


Fig. 7

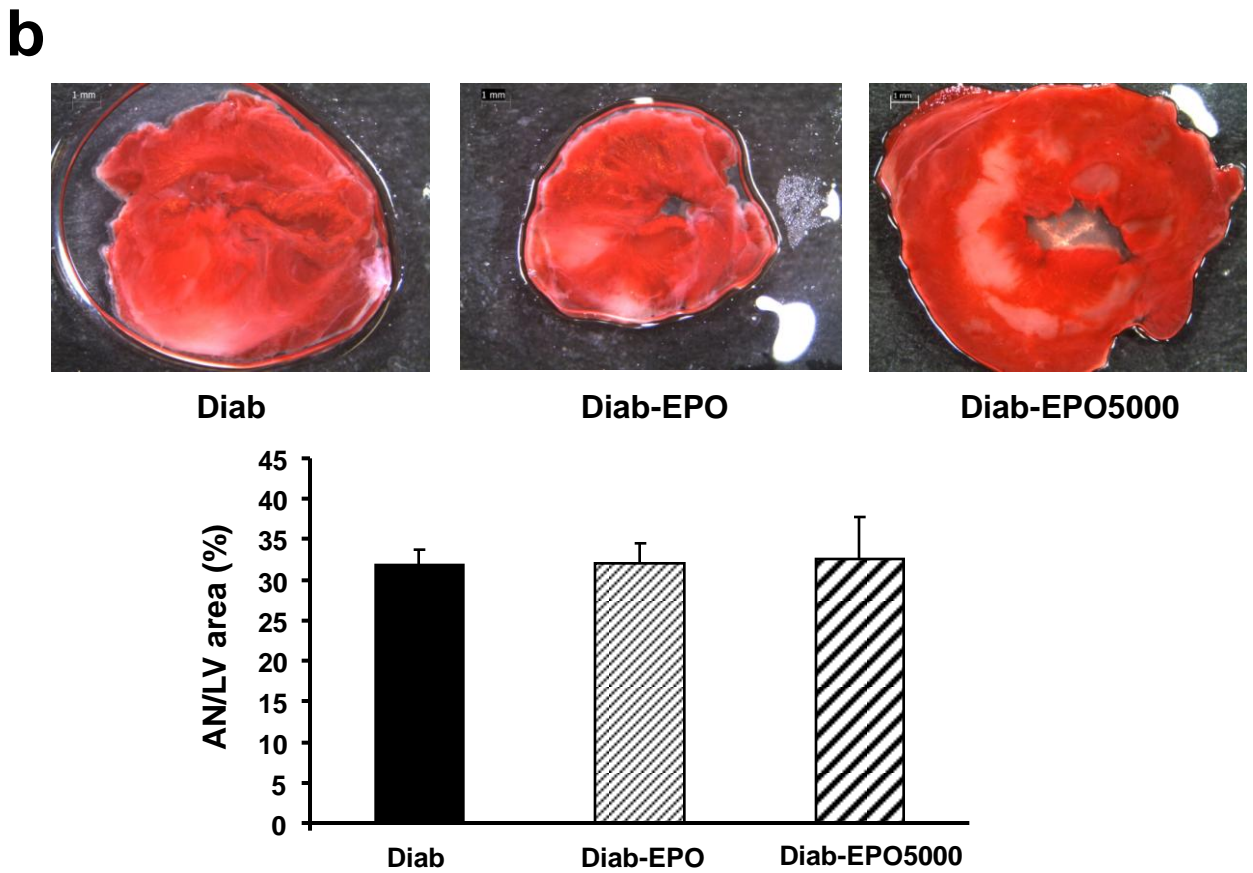
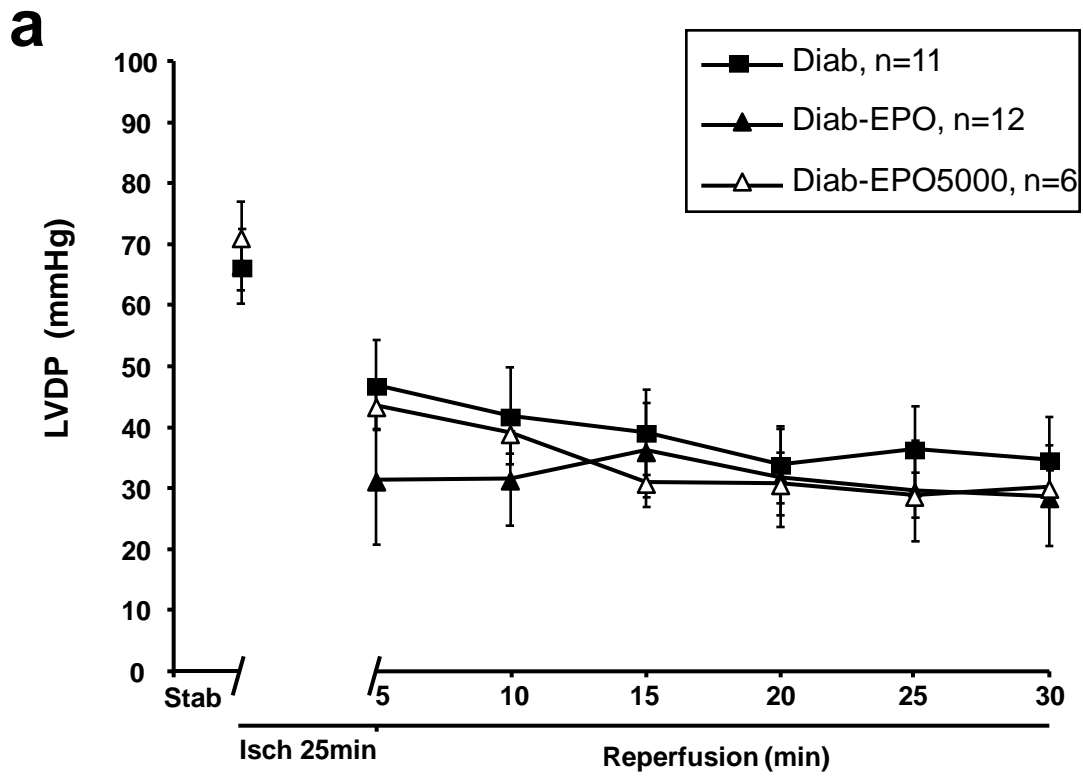


Fig. 8

4. Discussion

La plupart des études démontrant la cardioprotection de l'EPO ont été réalisées sur des animaux sains bien éloignés de la réalité clinique des patients coronariens. Dans cette deuxième partie du travail nous avons démontré que l'effet cardioprotecteur de l'EPO contre les lésions d'I/R était inhibé dans un modèle de diabète type 1 induit par la STZ chez le rat. Cependant cette cardioprotection induite par l'EPO semble maintenue en cas d'insulino-résistance.

L'explication de nos observations a été donnée par l'analyse des voies de signalisation impliquées dans le mécanisme cardioprotecteur de l'EPO. La voie RISK qui est connue comme étant la principale voie activée par l'EPO était altérée en présence du diabète. L'EPO n'a pas entraîné de phosphorylation de la voie PI3K/Akt ou de la voie ERK1/2 dans les cœurs des rats diabétiques. À l'inverse la voie RISK était conservée en présence de l'insulino-résistance.

L'inhibition de la cardioprotection induite par l'EPO en présence du diabète type 1 est similaire à ce qui a été observé avec d'autres traitements agissant par la voie RISK, tels que le préconditionnement ischémique (Tosaki et al. 1996 ; Kersten et al. 2000), le postconditionnement ischémique (Przyklenk et al. 2008), la morphine (Gross et al. 2007), l'isoflurane (Tanaka et al. 2002), le diazoxide (Kersten et al. 2001) et la remifentanil (Kim et al. 2009).

En conséquence de l'altération des deux composantes de la voie RISK (la PI3K/Akt et ERK1/2) la phosphorylation de leur effecteur en commun, la GSK-3 β , était aussi altérée en présence du diabète. L'absence d'inhibition de la GSK-3 β s'est accompagnée d'une perte de l'effet cardioprotecteur de l'EPO. Par contre, l'utilisation de l'inhibiteur spécifique de GSK-3 β , la SB216763 a montré un effet cardioprotecteur en présence du diabète. Cela supporte les résultats de Gross et al. qui ont montré l'absence de cardioprotection induite par la morphine en présence d'un même modèle de diabète type 1, alors que la SB216763 était cardioprotectrice (Gross et al. 2007).

L'absence d'effet de l'EPO en présence du diabète ne semble pas liée à une diminution de la sensibilité à l'EPO, puisque l'utilisation de doses plus élevées n'a

pas réussi à restaurer son effet cardioprotecteur. De façon similaire, Kehl et al. ont démontré qu'une hyperglycémie sévère (~ 600 mg/dl) altèrait la cardioprotection induite par l'isoflurane, et que l'utilisation des fortes doses ne permettait pas de restaurer son effet cardioprotecteur (Kehl et al. 2002). De plus, Kersten et al. ont démontré qu'une hyperglycémie sévère pouvait bloquer l'effet cardioprotecteur d'une forte dose de diazoxide, ce qui n'était pas le cas en présence d'une hyperglycémie modérée (Kersten et al. 2001). Chez des rats Goto-kakizaki caractérisés par une hyperglycémie modérée (~ 300 mg/dl), Tsang et al. ont démontré que l'augmentation du nombre des cycles du préconditionnement ischémique permettait de rétablir la cardioprotection et d'induire une augmentation plus importante de la phospho-Akt (Tsang et al. 2005). D'autre part, Przyklenk et al. ont montré récemment que le contrôle de la glycémie en appliquant une insulinothérapie pouvait aussi restaurer l'effet cardioprotecteur du postconditionnement ischémique dans un modèle des souris diabétiques (Przyklenk et al. 2008). La sévérité de l'hyperglycémie semble donc jouer un rôle crucial dans la résistance à la cardioprotection contre les lésions d'I/R. La restauration de l'effet cardioprotecteur par augmentation du nombre de stimuli du préconditionnement ou par une dose plus forte d'agents pharmacologiques semble possible en présence d'une hyperglycémie modérée (300 mg/dl) mais pas dans le cas d'une hyperglycémie sévère (600 mg/dl).

Peu de travaux ont été réalisés pour étudier l'efficacité des agents cardioprotecteurs en présence de l'insulino-résistance. Dans une étude faite sur des rats WOKW "*Wistar-Ottawa-Karlsburg W*", modèle mimant le syndrome métabolique caractérisé par une obésité, une hypertension modérée, une dyslipidémie, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose, des auteurs ont démontré une altération de l'effet cardioprotecteur du postconditionnement ischémique. Ils ont décrit une altération de la phosphorylation d'ERK1/2 et de la GSK-3 β en réponse au postconditionnement (Wagner et al. 2008). A l'inverse, dans notre modèle d'insulino-résistance l'EPO a gardé son effet cardioprotecteur associé à la voie RISK et GSK-3 β . Ces résultats contradictoires peuvent être liés à la différence entre les deux modèles d'insulino-résistance utilisés et à la durée d'exposition des rats à l'insulino-résistance. Dans notre modèle l'insulino-résistance a été induite en soumettant les rats à un régime hypercalorique durant 4 semaines alors que dans le modèle de WOKW génétiquement modifié, les rats étaient âgés de 18 semaines. L'altération

Projet 3 : Implication de la voie RISK/GSK-3 β dans le mécanisme d'action du postconditionnement à distance : comparaison avec le postconditionnement classique

1. Introduction

Malgré son effet cardioprotecteur est bien démontré dans plusieurs études expérimentales (Zhao et al. 2003 ; Tsang et al. 2004 ; Kin et al. 2005 ; Yang et al. 2005) et clinique (Staat et al. 2005), le IPost classique n'est applicable que chez les patients reperfusés par PCI. L'effet cardioprotecteur du postconditionnement à distance, RIPost est plus prometteur. Il peut être appliqué simplement au niveau d'un membre supérieur ou inférieur. Cependant, son mécanisme d'action n'est pas connu.

L'objectif de ce projet était d'identifier si le RIPost utilise les mêmes voies de signalisation cardioprotectrice que le IPost classique, à savoir la voie RISK, avec ces deux composantes la voie PI3K/Akt et la voie ERK1/2. L'hypothèse d'une meilleure cardioprotection obtenue en associant le IPost classique à un RIPost a également été testée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Modèle expérimental

Des rats Wistar males âgés de 10 semaines ont été utilisés. Les expérimentations ont été menées en accord avec le comité régional d'éthique en expérimentation animale (CREEA) des Pays de la Loire.

Les rats ont été anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (Pentotal[®]; Ceva Santé Animal Solution injectable, 60 mg/kg de masse corporelle). Une fois le rat complètement endormi, une intubation oro-trachéale a été pratiquée par une canule de 16 gauges de diamètre interne en contrôlant visuellement la filière pharyngo-laryngée. Une ventilation mécanique a été assurée durant toute la période de la sédation de l'animal par un respirateur SAR-830 (CWE[®], Ardmore, PA). Les paramètres de ventilation (fréquence respiratoire

63/minute, pression inspiratoire 12 cm Hg, pression expiratoire nulle) ont été fixés au préalable. La température corporelle a été maintenue à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante connectée à un régulateur de température relié à une sonde rectale (HB101/2 RS, BIOSEB, France). La pression artérielle a été surveillée par une sonde Millar introduite dans la carotide et reliée à une station hémodynamique (IOX 1,593). Une sternotomie a été réalisée de façon à ligaturer l'artère coronaire interventriculaire antérieure gauche (IVA) avec un fil non résorbable (fil Premio 7/0, Péters surgical®). Les deux extrémités de ce fil qui entoure l'IVA ont été introduites dans un petit tube de plastique maintenu contre l'IVA à l'aide d'un clip (DIEFFENBACH, Vessel Clips, 35 mm, str). L'ischémie a été confirmée par le blanchissement et l'akinésie de la paroi antérieure du myocarde en aval de la ligature.

2.2. Protocole expérimental

Tous les rats ont été soumis à une ischémie de 40 minutes suivie d'une reperfusion. Deux protocoles ont été utilisés dans cette étude. Dans le protocole 1 les rats ont été répartis dans 4 groupes :

- 1) Groupe contrôle : 40 min d'ischémie myocardique par ligature de l'IVA suivie d'une reperfusion sans autre intervention supplémentaire.
- 2) Groupe postconditionnement classique (IPost) : trois cycles de 10 sec de re-occlusion de l'IVA suivis de 10 sec de reperfusion ont été appliqués dès la reperfusion.
- 3) Groupe postconditionnement à distance (RIPost) : 20 min après l'induction de l'ischémie myocardique la patte inférieure du rat a été ligaturée pendant 10 min. La ligature de la patte a été réalisée en appliquant un fil élastique autour de ce membre et le serrant fort jusqu'à décoloration de la patte. Le fil est resté maintenu pendant 10 min avec un blanchissement de la patte et une diminution de la température sous-cutanée distale.
- 4) Groupe IPost + RIPost : les deux procédures IPost et RIPost ont été combinées.

Les mêmes groupes ont été réalisés dans le protocole 2 en injectant 15 minutes après induction de l'ischémie myocardique un inhibiteur spécifique de la voie PI3K/Akt (la wortmannin, 15µg/kg) ou inhibiteur spécifique de la voie ERK1/2 (U-0126, 200µg/kg).

Six rats de chaque groupe ont été reperfusés pendant 2h, tout en contrôlant la température et l'état d'endormissement du rat. En cas de besoin une faible dose de pentobarbital a été réinjectée en intra-péritonéal. À la fin de la reperfusion le cœur a été prélevé pour mesurer l'aire à risque et la taille d'infarctus par un marquage TTC+Bleu d'Evans.

Pour les groupes contrôle, IPost, RIPost et IPost+RIPost l'analyse des noyaux apoptotiques a été réalisée par un marquage TUNEL. Les noyaux ont été identifiés en utilisant un petit échantillon de la zone à risque du VG (marquée en rouge suite au marquage TTC+Bleu d'Evans) et un autre au niveau de la zone contrôle (marquée en bleu suite au marquage TTC+Bleu d'Evans). Ces échantillons ont été prélevés au niveau de la coupe médio-ventriculaire et inclus en paraffine.

Six rats de chaque groupe ont été reperfusés pendant 5, 10 et 15 minutes avant de prélever le cœur pour faire l'analyse des voies de signalisation (travail en cours).

Les techniques du marquage TTC et TUNEL ainsi que Western blot ont été décrites. Le marquage TTC a été adapté au modèle d'ischémie régionale utilisé dans ce projet. Une perfusion par le Bleu d'Evans après le prélèvement du cœur a été utilisée pour identifier la zone contrôle de la zone à risque. Après prélèvement du cœur, le fil laissé en place autour de l'IVA après la reperfusion a été religaturé. Une canule reliée à une seringue remplie de Bleu d'Evans (1% dilué dans du PBS) a été introduite dans l'aorte ascendante pour une injection coronaire et un marquage en bleu du myocarde normalement irrigué. Le TTC marque la zone infarctée en blanc, la zone à risque en rouge et le reste du myocarde normalement perfusé apparaît en bleu. La quantification de ces trois zones a été réalisée grâce au logiciel Image J et le rapport zone infarctée/zone à risque utilisé pour illustrer la taille d'infarctus.

3. Résultats

Les résultats de ce projet sont encore préliminaires.

Remote combined with local ischemic postconditioning in myocardial reperfusion injury management: effect on GSK-3 β phosphorylation

INTRODUCTION

Early and efficient reperfusion is the mainstay treatment of acute myocardial infarction (AMI). Paradoxically, blood flow restoration in the myocardium previously exposed to ischemia can induce damage named reperfusion injury (1). One important factor contributing to the reperfusion injury is the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) at the time of reperfusion (2). The mPTP opening can be inhibited by several kinases including the multifunctional protein glycogen synthase kinase GSK-3 β (3, 4). GSK-3 β is known as the downstream target of the reperfusion injury salvage kinase pathway (RISK) consisting of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) (5, 6). Among several cardioprotective strategies activating the RISK pathway, local ischemic postconditioning (IPost) consisting of brief intermittent episodes of reperfusion and re-occlusion of the coronary artery performed at the onset of reperfusion, has shown a potent cardioprotection in experimental (7, 8, 9) and clinical studies (10). Although several mechanisms involved in the IPost-induced cardioprotection have been identified, results from the current literature regarding the implication of GSK-3 β are conflicting (11, 12, 13).

Remote postconditioning (RIPost) consisting of transient ischemia of a variety of tissues, including the kidney, liver, gut, and skeletal muscle can protect the myocardium (14). While the mechanistic pathways implicated in the myocardial protection afforded by RIPost is not fully understood, the implication of RISK pathway has been reported (15). In this study we thought to investigate whether additive GSK-3 β phosphorylation can be obtained with the combination of RIPost and IPost and whether this strategy is a valuable option to prevent reperfusion injury.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats weighing 250-300 g were used in this study. All animals were treated in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996). The protocol was approved by our regional Animal Care and Use Committee.

Surgical preparation

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg) and orotracheally intubated with a 16 gauge tube. Deep anesthesia was maintained with intermittent intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (20-30 mg/kg). The animals were ventilated with oxygen-enriched room air using a small animal ventilator (SAR-830; CWE[®], Ardmore, PA) at a rate of 50-60 breaths per minute. Body temperature was maintained with a heating blanket set at 37°C.

The chest was open via a median sternotomy and the heart was exposed. A 7/0 polypropylene suture (Premio 7/0, Péters surgical[®]) was placed around the left main coronary artery (LAD). The end of the suture was threaded through a piece of tubing, forming a snare for reversible LAD occlusion. Cardiac ischemia was confirmed by a pale area below the suture, while reperfusion was characterized by rapid disappearance of cyanosis followed by vascular blush.

Experimental protocol

All rats underwent a total of 40 minutes coronary ligation followed by reperfusion using the open chest surgical approach described above. No more interventions were carried out in the control group (Ctrl).

IPost consisting of 3 cycles of 10 seconds occlusion of the LAD-10 seconds of perfusion was initiated immediately at reperfusion (16).

RIPost consisting of 10 minutes lower-limb ischemia followed by 10 minutes lower-limb reperfusion was initiated 20 minutes after LAD ligation. RIPost was created by placing a thin elastic around the upper one third of the hind extremity in tight position. Limb ischemia was confirmed by the paled colour of the limb.

Remote combined with local ischemic postconditioning in myocardial reperfusion injury management: effect on GSK-3 β phosphorylation

INTRODUCTION

Early and efficient reperfusion is the mainstay treatment of acute myocardial infarction (AMI). Paradoxically, blood flow restoration in the myocardium previously exposed to ischemia can induce damage named reperfusion injury (1). One important factor contributing to the reperfusion injury is the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) at the time of reperfusion (2). The mPTP opening can be inhibited by several kinases including the multifunctional protein glycogen synthase kinase GSK-3 β (3, 4). GSK-3 β is known as the downstream target of the reperfusion injury salvage kinase pathway (RISK) consisting of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) (5, 6). Among several cardioprotective strategies activating the RISK pathway, local ischemic postconditioning (IPost) consisting of brief intermittent episodes of reperfusion and re-occlusion of the coronary artery performed at the onset of reperfusion, has shown a potent cardioprotection in experimental (7, 8, 9) and clinical studies (10). Although several mechanisms involved in the IPost-induced cardioprotection have been identified, results from the current literature regarding the implication of GSK-3 β are conflicting (11, 12, 13).

Remote postconditioning (RIPost) consisting of transient ischemia of a variety of tissues, including the kidney, liver, gut, and skeletal muscle can protect the myocardium (14). While the mechanistic pathways implicated in the myocardial protection afforded by RIPost is not fully understood, the implication of RISK pathway has been reported (15). In this study we thought to investigate whether additive GSK-3 β phosphorylation can be obtained with the combination of RIPost and IPost and whether this strategy is a valuable option to prevent reperfusion injury.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats weighing 250-300 g were used in this study. All animals were treated in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996). The protocol was approved by our regional Animal Care and Use Committee.

Surgical preparation

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (60 mg/kg) and orotracheally intubated with a 16 gauge tube. Deep anesthesia was maintained with intermittent intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (20-30 mg/kg). The animals were ventilated with oxygen-enriched room air using a small animal ventilator (SAR-830; CWE[®], Ardmore, PA) at a rate of 50-60 breaths per minute. Body temperature was maintained with a heating blanket set at 37°C.

The chest was open via a median sternotomy and the heart was exposed. A 7/0 polypropylene suture (Premio 7/0, Péters surgical[®]) was placed around the left main coronary artery (LAD). The end of the suture was threaded through a piece of tubing, forming a snare for reversible LAD occlusion. Cardiac ischemia was confirmed by a pale area below the suture, while reperfusion was characterized by rapid disappearance of cyanosis followed by vascular blush.

Experimental protocol

All rats underwent a total of 40 minutes coronary ligation followed by reperfusion using the open chest surgical approach described above. No more interventions were carried out in the control group (Ctrl).

IPost consisting of 3 cycles of 10 seconds occlusion of the LAD-10 seconds of perfusion was initiated immediately at reperfusion (16).

RIPost consisting of 10 minutes lower-limb ischemia followed by 10 minutes lower-limb reperfusion was initiated 20 minutes after LAD ligation. RIPost was created by placing a thin elastic around the upper one third of the hind extremity in tight position. Limb ischemia was confirmed by the paled colour of the limb.

In protocol 1: Ctrl, IPost, RIPost and IPost+RIPost groups were used for TTC staining and TUNEL analysis after 2 hours of reperfusion. Other rats from each group were reperfused for 5, 10 and 15 min for Western blot analysis (Fig 1A).

In protocol 2: Specific inhibitor of PI3K/Akt signalling pathway (Wortmannin, Wort, 15µg/kg) was injected intravenously 15 minutes after the index of ischemia in Ctrl, IPost, RIPost and IPost+RIPost groups. Rats were reperfused for 2 hours and used for TTC staining. Same protocol was carried out with the specific inhibitor of ERK1/2 (U0126, 200µg/kg) (Fig 1B).

Infarct size measurement

After 2h of reperfusion rats were sacrificed, LAD was re-occluded and 1% Evans blue dye was retrogradely injected into the ascending aorta to delineate the area at risk. The left ventricle (LV) was then sectioned from apex to base into 5 to 6 one-mm sections. Sections were incubated in 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) in phosphate buffer solution, pH 7.4 at 37°C for 10 minutes and then fixed in 10% formalin. For each section, the area at risk (AAR) and the area of the infarction (INF) were quantified by planimetry using Image J software (NIH, Bethesda, MD). Infarct size was expressed as a percentage of total LV area at risk.

Determination of myocardial apoptosis

Detection of apoptotic cells in 5 hearts from each group was carried out using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL) method. After infarct size assessment, LV tissues from area at risk and remote virgin myocardium were fixed in formalin and then stored at 4°C. The tissues were then embedded in paraffin and cut into 5µm thick sections. The sections were stained using *in situ* DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, the sections were deparaffinized and rehydrated using xylene and graded alcohol series. After digestion in proteinase K (20 µg/ml) for 20min, each section was incubated with a TUNEL reaction mixture in a humidified chamber at 37°C for 60min, 2xSSC for 15min, 0.3% hydrogen peroxide for 5min, and finally with streptavidin for 30min, then stained with DAB/H₂O₂ for 10min and counterstained with hematoxylin

In protocol 1: Ctrl, IPost, RIPost and IPost+RIPost groups were used for TTC staining and TUNEL analysis after 2 hours of reperfusion. Other rats from each group were reperfused for 5, 10 and 15 min for Western blot analysis (Fig 1A).

In protocol 2: Specific inhibitor of PI3K/Akt signalling pathway (Wortmannin, Wort, 15µg/kg) was injected intravenously 15 minutes after the index of ischemia in Ctrl, IPost, RIPost and IPost+RIPost groups. Rats were reperfused for 2 hours and used for TTC staining. Same protocol was carried out with the specific inhibitor of ERK1/2 (U0126, 200µg/kg) (Fig 1B).

Infarct size measurement

After 2h of reperfusion rats were sacrificed, LAD was re-occluded and 1% Evans blue dye was retrogradely injected into the ascending aorta to delineate the area at risk. The left ventricle (LV) was then sectioned from apex to base into 5 to 6 one-mm sections. Sections were incubated in 1% triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) in phosphate buffer solution, pH 7.4 at 37°C for 10 minutes and then fixed in 10% formalin. For each section, the area at risk (AAR) and the area of the infarction (INF) were quantified by planimetry using Image J software (NIH, Bethesda, MD). Infarct size was expressed as a percentage of total LV area at risk.

Determination of myocardial apoptosis

Detection of apoptotic cells in 5 hearts from each group was carried out using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL) method. After infarct size assessment, LV tissues from area at risk and remote virgin myocardium were fixed in formalin and then stored at 4°C. The tissues were then embedded in paraffin and cut into 5µm thick sections. The sections were stained using *in situ* DeadEnd™ Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, the sections were deparaffinized and rehydrated using xylene and graded alcohol series. After digestion in proteinase K (20 µg/ml) for 20min, each section was incubated with a TUNEL reaction mixture in a humidified chamber at 37°C for 60min, 2xSSC for 15min, 0.3% hydrogen peroxide for 5min, and finally with streptavidin for 30min, then stained with DAB/H₂O₂ for 10min and counterstained with hematoxylin

for 2min. The sections were washed in tap water, and then dehydrated, clarified, and mounted. Staining was viewed using an Olympus BX40 microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, USA). Two sections from each myocardial sample were randomly selected, and ten microscopic fields per section were evaluated by a blind observer. In each field, nuclei were counted, and the percentage of apoptotic nuclei stained dark brown (TUNEL-positive nuclei) was calculated.

Protein analyses and western blotting

For analysis of Akt, ERK and GSK-3 β phosphorylation, hearts were collected 5, 10 and 15 minutes after reperfusion. Samples from infarct area and remote area of the LV were freeze in liquid nitrogen before being stored at -80°C. Approximately 200 mg of powdered ventricular tissue was used for protein extraction. Frozen myocardial tissue samples were homogenized on ice in 1ml ice-cold lysis buffer then centrifuged, and the resulting supernatant was collected. Protein concentration was determined using Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to manufacturer instructions. Aliquots of the supernatant containing equal amounts of proteins (40 μ g) were loaded, electrophoresed on SDS-PAGE gel, and transferred to nitrocellulose membrane. The phosphorylation state of Akt (phospho-Akt, Ser⁴⁷³), ERK1/2 (phospho-ERK1/2), and GSK-3 β (phospho-GSK-3 β , Ser⁹), and total levels of Akt, ERK1/2, and GSK-3 β were analyzed as previously described (16) using antibodies obtained from Cell Signaling Technology. The band densities were determined semi-quantitatively using a lumino-image analyzer, LAS-3000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Drugs

Pentobarbital sodium was obtained from Ceva Santé Animal. Wortmannin and U0126 were purchased from Sigma. Wortmannin and U0126 were dissolved in DMSO and diluted into buffer such that the vehicle constituted less than 1% of the total volume.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using StatView software version 5.0. Differences between groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by LSD correction. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

RESULTS

Infarct size data. IPost alone and RIPost alone significantly reduced infarct size as compared with controls (Infarct size/AAR = $54.93 \pm 6.46\%$ in controls, $34.25 \pm 3.36\%$ in IPost, $24.69 \pm 6.02\%$ in RIPost; both $p < 0.05$ vs Controls) (Fig. 2). Cardioprotection induced by IPost or RIPost was blocked with the use of Wort, PI3K/Akt inhibitor or U0126, ERK1/2 inhibitor (Fig. 3).

Infarct size was significantly lower in rats receiving RIPost combined to IPost as compared to controls or IPost alone ($18.04 \pm 4.86\%$ in IPost+RIPost group vs. $54.93 \pm 6.46\%$ in Ctrl group and $34.25 \pm 3.36\%$ in IPost group, $p < 0.05$ for both) (Fig. 2).

Evaluation of apoptosis. TUNEL staining of LV samples taken from area at risk showed a lower percentage of apoptotic nuclei (positive staining nuclei) in IPost, RIPost and IPost+RIPost in comparison with controls (Fig. 4A). The level of apoptotic nuclei in samples from remote myocardium was similar in all the experimental groups (Fig. 4B).

Protocol 1

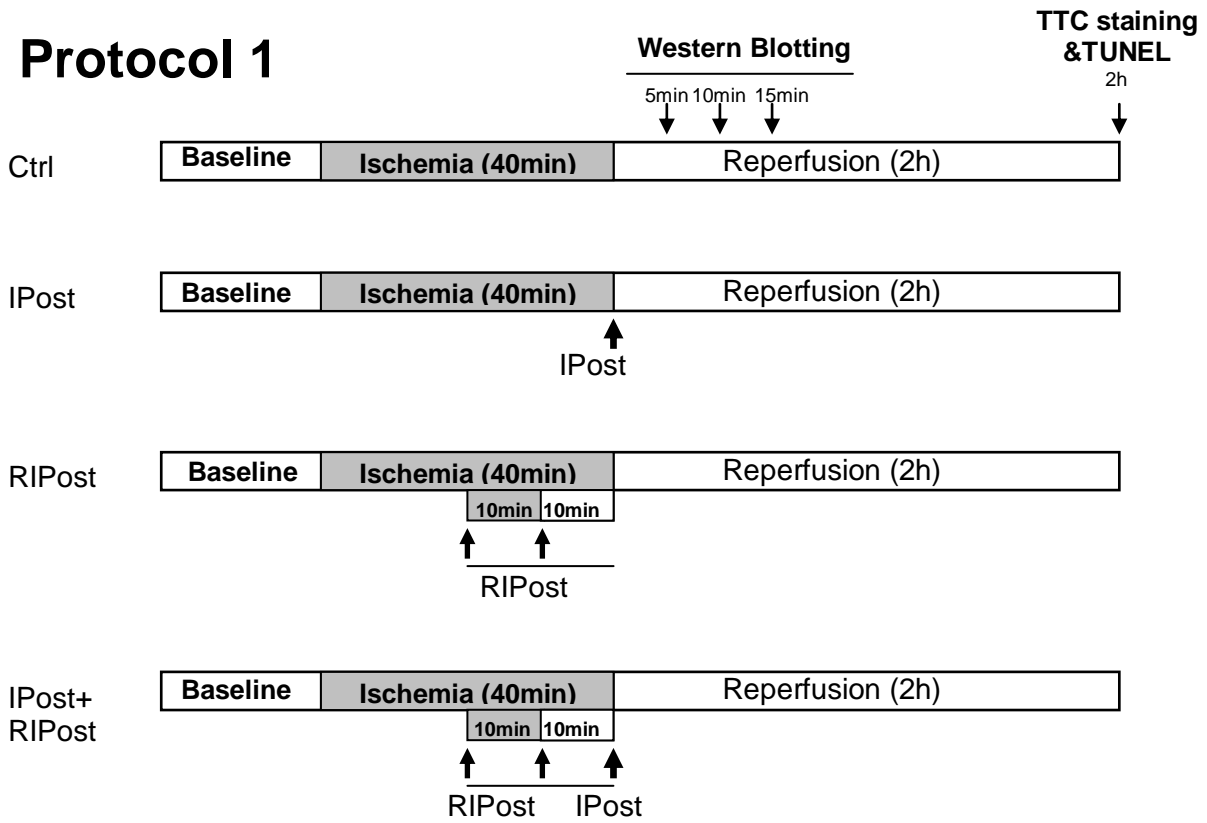


Fig. 1A

Protocol 2

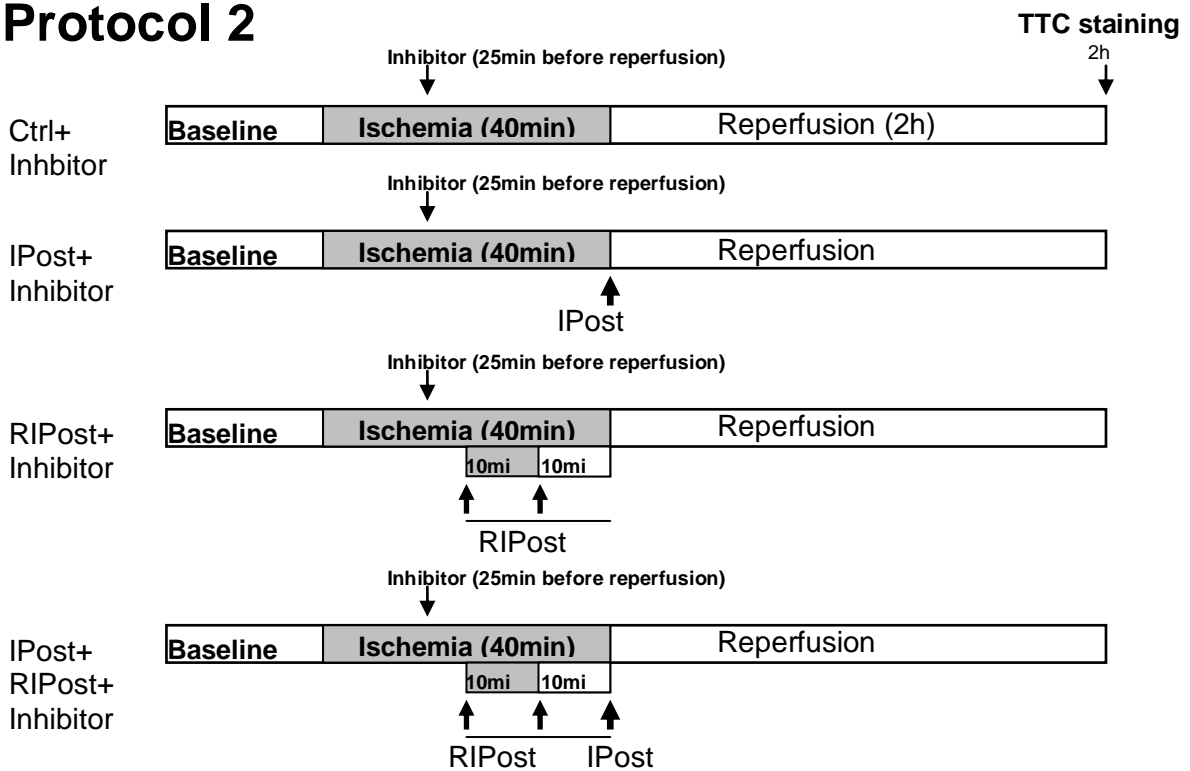


Fig. 1B

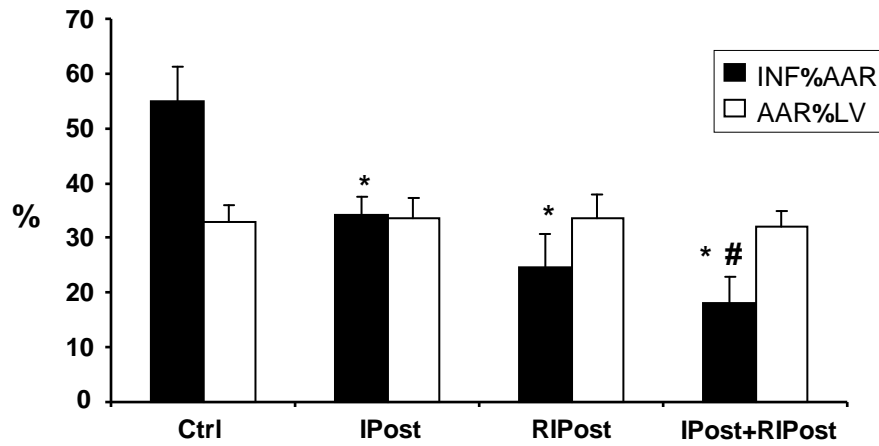
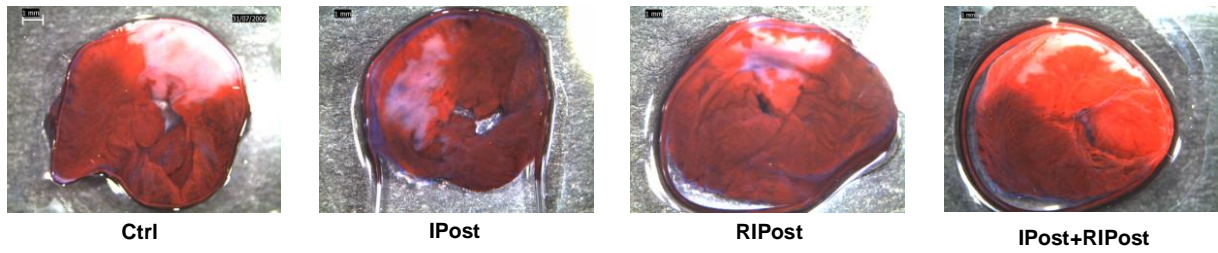


Fig. 2

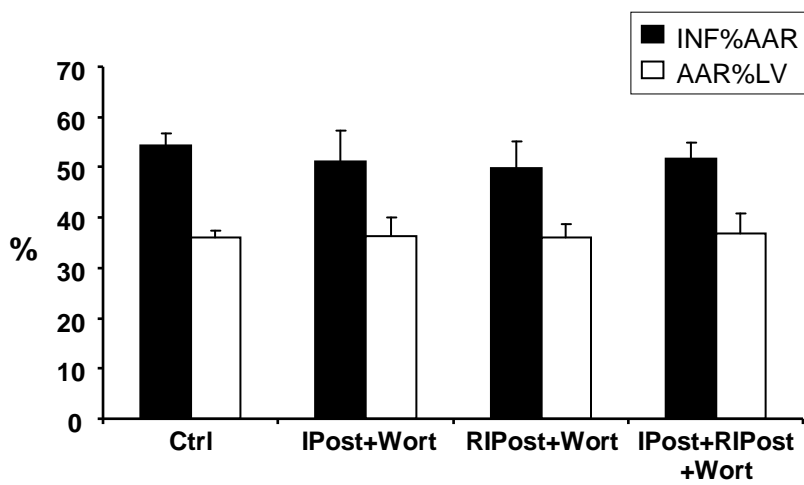
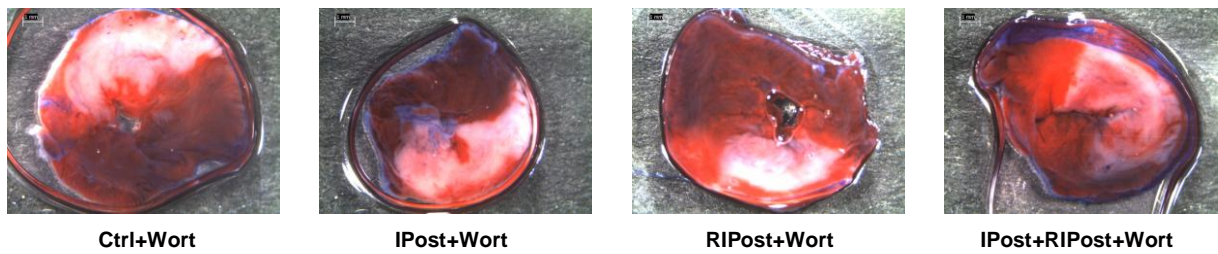


Fig. 3A

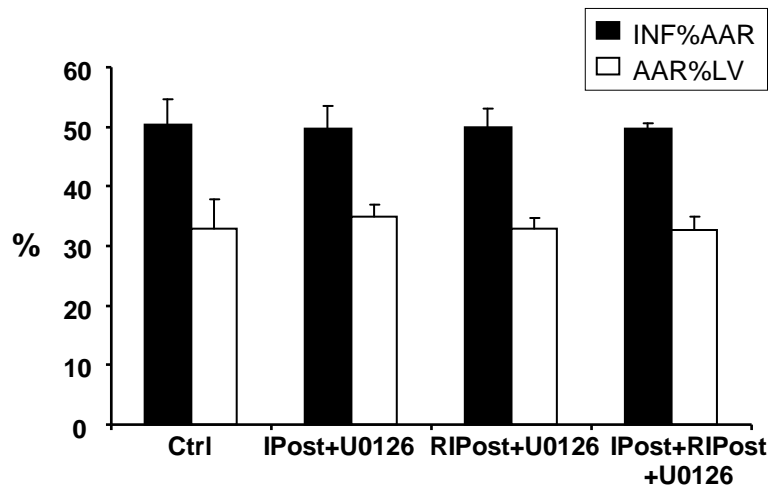
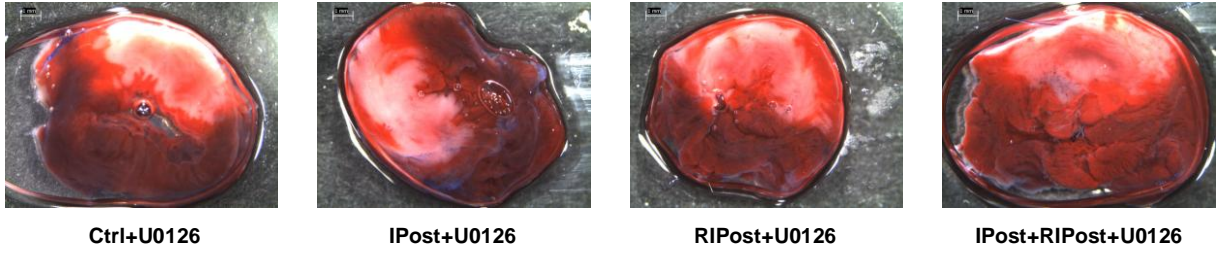
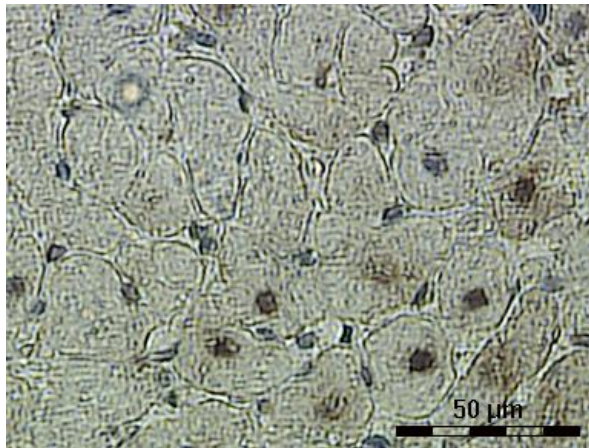
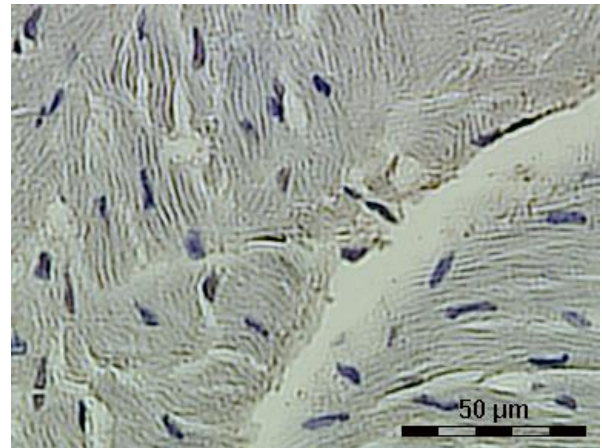


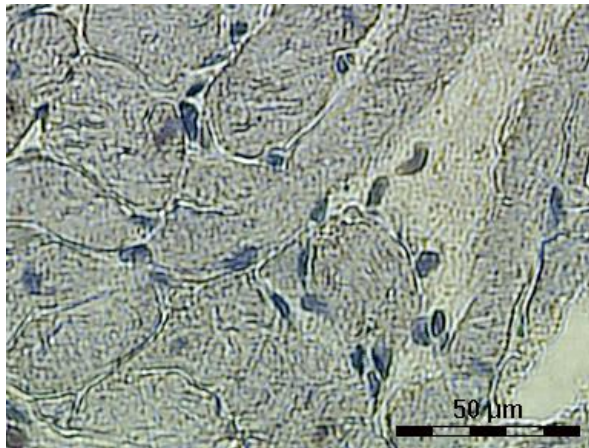
Fig. 3B



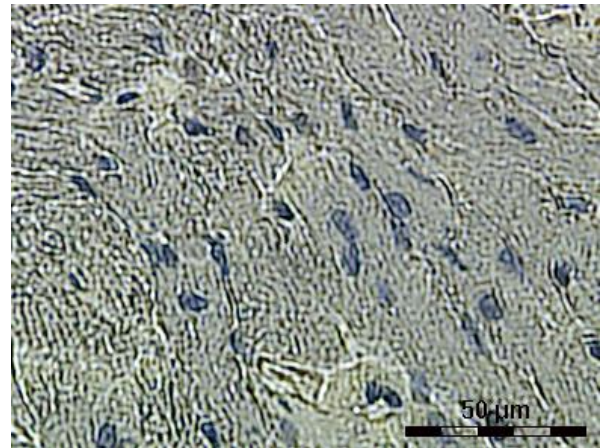
Ctrl



IPost



RIPost



IPost+RIPost

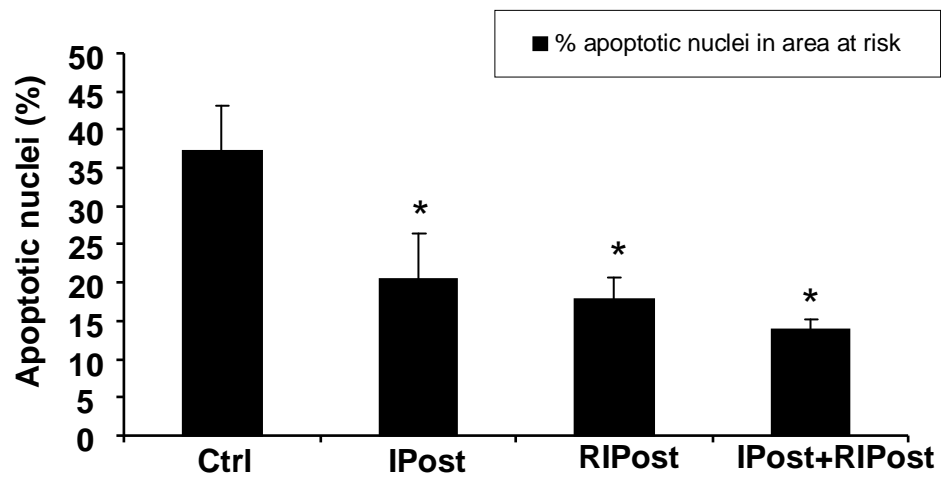


Fig. 4A

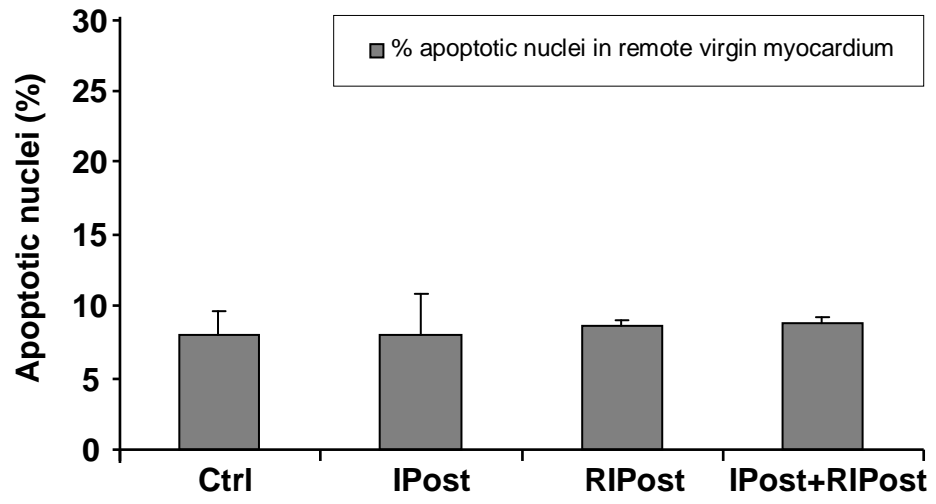


Fig. 4B

FIGURES LEGENDS

Figure 1. A. Open chest operated Wistar rats were subjected to 40 min coronary occlusion followed by 2h reperfusion and assigned into 4 groups: 1) Ctrl group, rats received no more intervention; 2) IPost group, rats received at the initial of reperfusion 3 cycles of 10 sec reperfusion followed by 10 sec coronary re-occlusion; 3) RIPost group, 20 min after coronary ligation rats received 1 cycle of 10 min limb ischemia followed by 10 min limb reperfusion (see text for details); 4) IPost+RIPost group, rats received both IPost and RIPost manoeuvres. B. Same protocol as described in panel A was performed. For each group specific inhibitor was intravenously injected 25 min before reperfusion started. Two inhibitors were used, Wortmannin (PI3K/Akt inhibitor) and U0126 (ERK1/2 inhibitor).

Figure 2. Infarct size expressed as a percentage of risk area (black bar) and risk area expressed as a percentage of LV area (white bar). Ctrl (control; n=6), IPost (postconditioning; n=7), RIPost (remote postconditioning; n=6) and IPost+RIPost (n=6). * $p < 0.05$ vs. Ctrl, # $p < 0.05$ vs. IPost.

Figure 3. Infarct size expressed as a percentage of risk area (black bar) and risk area expressed as a percentage of LV area (white bar). A. Groups with Wortmannin (Wort), Ctrl+Wort (control+Wort; n=3), IPost+Wort (postconditioning+Wort; n=6), RIPost+Wort (remote postconditioning+Wort; n=6) and IPost+RIPost+Wort (n=6). B. Groups with U0126, Ctrl+U0126 (n=3), IPost+U0126 (n=6), RIPost+U0126 (n=6) and IPost+RIPost+U0126 (n=6).

Figure 4. Effect of IPost and RIPost on apoptosis after myocardial infarction. TUNEL staining at risk area of LV for each group. Apoptotic nuclei appear brown stained (positive nuclei), whereas TUNEL-negative nuclei appear blue with hematoxylin. Bar graph showed the quantification of the percentage of positive staining cells at risk area (A) and virgin myocardium (B) for each group. Ctrl (control; n=4), IPost (postconditioning; n=5), RIPost (remote postconditioning; n=5) and IPost+RIPost (n=4). * $p < 0.05$ vs. Ctrl.

REFERENCES

1. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007 Sep 13;357(11):1121-35.
2. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 1995 Apr 1;307 (Pt 1):93-8.
3. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. 2004 Jun;113(11):1535-49.
4. Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, Shimamoto K. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Nov;43(5):564-70.
5. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*. 2006 Jan;69(1):178-85
6. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15;61(3):448-60.
7. Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Feb;288(2):H971-6.
8. Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Hausenloy DJ, Yellon DM. Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway. *Basic Res Cardiol*. 2007 Sep;102(5):453-9.
9. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. 2004 Aug 6;95(3):230-2.

10. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005 Oct 4;112(14):2143-8.
11. Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*. 2008 May 27;117(21):2761-8.
12. Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M, Marber MS. Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse. *Circ Res*. 2008 Aug 1;103(3):307-14.
13. Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res*. 2009 Jan 2;104(1):15-8.
14. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008 Aug 1;79(3):377-86.
15. Xin P, Zhu W, Li J, Ma S, Wang L, Liu M, Li J, Wei M, Redington AN. Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jun;298(6):H1819-31.
16. Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Dec;297(6):H2035-43.

4. Discussion

Les résultats préliminaires de cette troisième partie du travail ont montré que l'application d'un cycle de 10 min ischémie/10 min reperfusion au niveau de la patte inférieure, 20 min avant la reperfusion myocardique entraînait une réduction significative de la taille d'infarctus. Comparé à la cardioprotection induite par un IPost locale, le RIPost a montré un effet cardioprotecteur similaire dans notre modèle expérimental. De plus, l'application d'un RIPost avec un IPost a entraîné une tendance à une meilleure cardioprotection que IPost ou RIPost seuls. L'effet cardioprotecteur du RIPost semble être médié par l'activation de la voie RISK.

L'effet cardioprotecteur du protocole IPost utilisé dans cette étude (3 cycles de 10 sec ischémie/10 sec reperfusion) avait déjà été mis en évidence dans notre laboratoire sur un même modèle expérimental (cf. projet 1).

La cardioprotection induite par le RIPost en utilisant un membre inférieur a été démontrée dans plusieurs études expérimentales. Andreka et al. l'ont démontrée avec un RIPost de 4 cycles de 5 min ischémie/5 min reperfusion dans un modèle d'IDM chez le porc (Andreka et al. 2007). Li et al. ont rapporté une cardioprotection induite par le RIPost comparable à celle d'un IPost local chez le rat (Li et al. 2006). Xin et al. ont testé la cardioprotection induite par différents protocoles de RIPost. L'association de ces différents RIPost à un IPost local n'a pas montré une meilleure cardioprotection que RIPost seul (Xin et al. 2010).

Le mécanisme d'action du RIPost n'a pas été largement étudié. L'implication de la voie RISK dans son mécanisme d'action a été récemment étudiée dans une étude réalisée chez le rat (Xin et al. 2010). Comme dans notre travail, l'inhibition de la voie PI3K/Akt et d'ERK1/2 a entraîné une inhibition de l'effet cardioprotecteur du RIPost. Xin et al. ont montré que le RIPost entraînait une augmentation significative de la phosphorylation d'Akt et d'ERK1/2. Une augmentation de la Bcl-2 anti-apoptotique chez les groupes IPost, RIPost et IPost+RIPost a été également rapporté dans cette étude. L'analyse protéique est en cours de réalisation dans notre travail (phosphorylation d'Akt, d'ERK1/2 et de la GSK-3 β). À notre connaissance, l'implication de la GSK-3 β dans le RIPost n'a jamais été étudiée. De plus, nous

envisageons d'analyser ces voies de signalisation au niveau de la zone à risque et au niveau des échantillons de myocarde loin de la zone à risque (zone contrôle), pour mieux comprendre le mécanisme de la cardioprotection induite par le RIPost.

Parallèlement à ce que nous avons observé sur la réduction de la taille d'infarctus, l'association du RIPost+IPost n'a pas entraîné un effet anti-apoptotique additif en comparant au RIPost seul. Cet effet anti-apoptotique du RIPost avait été mis en évidence par Xin et al. au niveau de la zone à risque (Xin et al. 2010). Dans notre étude nous avons évalué l'apoptose au niveau de la zone à risque et au niveau de la zone contrôle. Le taux des noyaux apoptotiques au niveau de la zone contrôle était similaire dans les quatre groupes de l'étude. Le RIPost semble donc n'avoir aucun effet sur le tissu non exposé directement à l'ischémie. L'analyse western blot va nous permettre de confirmer cette hypothèse.

La compréhension du mécanisme d'action du RIPost nécessite des travaux complémentaires pour identifier l'implication d'autres voies de signalisation (la voie SAFE par exemple) et surtout pour identifier les médiateurs qui transmettent le message de l'organe à distance vers le myocarde.

Les résultats de ce projet doivent être interprétés avec certaines limites. Premièrement, les échantillons prélevés de la zone à risque du VG pour l'analyse des voies de signalisation ont été collectés d'une manière approximative. Afin d'éviter l'altération des protéines, le tissu a été prélevé rapidement après l'isolement du cœur et congelé dans l'azote liquide. La réalisation d'un marquage TTC pour identifier la zone à risque n'était pas possible.

Le modèle animal utilisé dans cette étude constitue la deuxième limite. Les données bibliographiques sur l'effet cardioprotecteur du IPost chez le rat ont été controversées (Dow et Kloner. 2007 ; Zatta et al. 2008). De plus un seul protocole a été utilisé dans ce projet. La cardioprotection induite par ce protocole du IPost a été déjà démontrée chez le rat dans notre laboratoire.

En conclusion le RIPost semble être un moyen aussi efficace que le IPost pour limiter la survenue des lésions de reperfusion. La voie RISK semble être impliquée dans le mécanisme de la cardioprotection induite par le RIPost. L'analyse

des voies de signalisation par l'insulino-résistance apparaît peut être après un temps d'exposition plus prolongé.

Si les résultats de notre travail montrent l'absence d'effet cardioprotecteur de l'EPO en présence du diabète, nous ne distinguons pas le rôle respectif de l'hyperglycémie ou l'hypoinsulinémie. Cependant, plusieurs études expérimentales ont déjà démontré l'implication de l'hyperglycémie dans le mécanisme de l'altération de la réponse cardioprotectrice. Raphael et al. ont démontré que l'hyperglycémie entraînait une inhibition de l'effet cardioprotecteur de l'isoflurane suite à l'altération de la voie PI3K/Akt et de la eNOS "*endothelial nitric oxide synthase*" (Raphael et al. 2010). De même, Amour et al. ont rapporté que les agents régulateurs de la eNOS jouant un rôle crucial dans la cardioprotection induite par les anesthésiques volatils étaient perturbés par l'hyperglycémie (Amour et al. 2010). D'autre part, la normoglycémie observée dans notre modèle d'insulino-résistance semble être indispensable pour le maintien de l'effet cardioprotecteur de l'EPO bien qu'elle soit associée à une hyperinsulinémie qui peut elle aussi contribuer à la cardioprotection.

Étant donné le court délai d'exposition au diabète ou à l'insulino-résistance dans nos modèles expérimentaux, l'extension de ces résultats à l'homme nécessite des travaux complémentaires. Les analyses des sous-groupes de patients diabétiques inclus dans les essais cliniques en cours avec l'EPO et IPost fourniront des compléments de réponses.

Western blot des voies de signalisation va nous confirmer cette donnée. A cet égard, le RIPost moins invasif et aussi efficace que IPost, peut avoir un espoir thérapeutique majeur chez l'homme.

DISCUSSION GÉNÉRALE- PERSPECTIVES

Chapitre III. Discussion et Perspectives

Il est bien établi que la reperfusion précoce est l'élément clé dans le traitement de l'IDM. Le pronostic des patients présentant un IDM à la phase aiguë a été nettement amélioré après la mise au point de la revascularisation par PCI ou par des agents thrombolytiques. À côté de tous les progrès réalisés pour une prise en charge rapide des patients, le développement d'un traitement adjuvant à la reperfusion semble nécessaire pour améliorer encore la morbi-mortalité.

La réduction de la taille d'infarctus par le postconditionnement ischémique ou pharmacologique a été rapportée dans plusieurs études expérimentales et dans des études cliniques à effectifs réduits (Tableau 3).

Reference	Patient selection	Time (min)	N	Protocol	Effect
Laskey. 2005	<12h LAD, RCA, LCx	341	17	2 cycles of 90 sec R/I	Improved ST-segment resolution. Improved coronary flow velocity. No difference in peak CK.
Staat et al. 2005	<6h LAD or RCA	318	30	4 cycles of 60 sec R/I	Improved ST-segment resolution. Improved MBG, 36% reduction in 72h CK.
Ma et al. 2006	<12h LAD, RCA, LCx	396	94	3 cycles of 30 sec R/I	Improved WMSI, endothelial function. Less CK ($p=ns$).
Yang et al. 2007	<12h LAD, RCA, LCx	312	41	3 cycles of 30 sec R/I	27% reduction in 72h CK. 27% reduction in MI SPECT 1 week.
Thibault et al. 2008	<6h LAD or RCA	283	38	4 cycles of 60 sec R/I	40% reduction in CK. 47% reduction in troponin I. 39% reduction in MI SPECT 6 months. 7% increase in LVEF at 12 months.
Laskey et al. 2008	<6h LAD	228	24	2 cycles of 90 sec R/I	Improved ST-segment resolution. Improved coronary flow velocity.
Zhao et al. 2009	<12h LAD, RCA, LCx	264	75	3 cycles of 30 or 60 sec R/I	Reduced apoptosis at 7 days.

Lønborg et al. 2010	<12h LAD, RCA, LCx	255	118	4 cycles of 30 sec R/I	19% relative reduction of MI size at 3 months. 31% increase in myocardial salvage ratio. 41% reduction in patients developing heart failure.
Nikolaidis et al. 2004	<12h LAD, RCA, LCx	128	21	GLP-1 infusion for 72h post-PCI	Improved LVEF.
Kloner et al. 2006	<3.17h LAD	128	1066	50 or 70 mg/kg/min adenosine IV <15 min of PCI	Reduction in 1-month mortality (9.4 vs 4.2%). Reduction in 6-month mortality (11.2 vs 7.3%). Reduction in 6-month composite clinical endpoint of death, in hospital CHF, or rehospitalization for CHF (17.2 vs 12.0%).
Kitakaze et al. 2007	<12h LAD, RCA, LCx	240	569	72h carperitide (ANP) IV infusion post-PCI	15% reduced total CK. No difference in troponin T. Improved reperfusion.
Kitakaze et al. 2007	<12h LAD, RCA, LCx	210	545	Nicorandil IV bolus, then 24h infusion	No difference in total CK or LVEF.
Bates et al. 2008	<6h LAD	127	94	0.05-5.0 mg IV KAI-9803 pre-PCI	Trend for reduced CK, troponin I, SPECT MI.
Piot et al. 2008	<12h LAD, RCA	292	58	2.5 mg/kg CsA IV bolus pre-PCI	40% reduction in CK. 13% reduction in troponin I ($p=ns$). 20% reduction in MI by CMR (N=27).
Mewton et al. 2010	<12h LAD, RCA	292	28	2.5 mg/kg CsA IV bolus pre-PCI	24% reduction in MI size on CMR at 6 months. Smaller increase in LV end-systolic volume.
Ferrario et al. 2009	<12h LAD, RCA, LCx	341	30	33.000 IU EPO bolus prior to PCI then 24. 48h later	30% reduction in CK-MB.
Suh et al. 2010	<12h LAD	341	57	50 IU/kg EPO bolus prior to PCI	No difference in infarct size by CK, CK-MB or CMR at 4 days.

Kim et al. 2010	<12h LAD	241	171	80 mg vs 10 mg oral atorvastatin prior to PCI	No difference in infarct size by CK-MB or troponin.
--------------------	----------	-----	-----	---	--

Tableau 3: Les études cliniques du postconditionnement ischémique et pharmacologique réalisées chez des patients ayant un IDM avec une élévation du segment ST (Ovize et al. 2010).

Dans l'étude AMISTAD-II, l'adénosine injectée 15 minutes avant une reperfusion par PCI a permis de diminuer la mortalité et les hospitalisations pour une insuffisance cardiaque chez les patients se présentant 3h au plus tard après le début des symptômes. Malgré ces résultats positifs obtenus, il n'est pas montré que l'effet bénéfique de l'adénosine est lié à une réduction de la taille d'infarctus (Kloner et al. 2006). Dans une autre étude clinique (J-WIND) l'administration du peptide anti-natriurétique recombinant (ANP) après une reperfusion par PCI a entraîné une diminution non significative de la taille d'infarctus et une amélioration de la fraction d'éjection 6 mois post-IDM. Par contre, dans cette même étude, l'utilisation du nicorandil (un activateur des canaux K^+_{ATP} et un donneur du NO) n'a montré aucun effet cardioprotecteur (Kitakaze et al. 2007). L'étude réalisée par Piot et al. sur l'effet de la CsA est la seule qui ait donné des résultats bénéfiques comparables à ceux observés dans l'étude clinique utilisant un postconditionnement ischémique. Dans cette étude une diminution de la taille d'infarctus a été observée en utilisant la CsA avant une reperfusion par PCI (cf. page 23) (Piot et al. 2008).

Les résultats des études cliniques types "*proof-of-concept*" doivent être confirmés par des études cliniques à grande échelle. Concernant le IPost, il est important d'établir des études démontrant le protocole le plus efficace à appliquer en fonction de la durée de l'ischémie myocardique. Les études précliniques et cliniques examinant la cardioprotection en présence d'une comorbidité ou d'une co-médication sont également nécessaires. Enfin, il est intéressant d'étudier l'interdépendance entre les différentes voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection et d'identifier la cible moléculaire optimale pour induire une protection.

Nouveaux espoirs dans la prise en charge des lésions de reperfusion

À côté des moyens cardioprotecteurs présentés dans ce travail, l'hypothermie pourrait être un moyen de prévention contre les lésions de reperfusion. Il s'agit de diminuer la température du cœur à 32-34°C durant l'ischémie. Le mécanisme par lequel l'hypothermie entraîne une cardioprotection demeure inconnu. La réduction de la consommation en ATP, de l'acidose intracellulaire et de la surcharge sodique et calcique peut être impliquée dans son mécanisme d'action (Simkhovich et al. 2004 ; Anderson et al. 2006). Il semble que l'hypothermie réduit la demande énergétique du cœur et inhibe le processus intracellulaire impliqué dans le mécanisme de la nécrose cellulaire (Ning et al. 2007). L'effet cardioprotecteur de l'hypothermie n'est observé que si elle est initiée le plus tôt possible après l'induction de l'ischémie (Tissier et al. 2009). Sur des modèles expérimentaux, cela peut être obtenu en appliquant la technique du TLV "*Total liquid ventilation*" avec du perfluorocarbène à température contrôlée. Tissier et al. ont démontré que l'hypothermie induite chez le lapin 5 minutes après la ligature de l'artère coronaire entraînait une réduction de la taille d'infarctus mesurée 3 jours après la reperfusion. De plus, une récupération de la fonction contractile et une inhibition de l'ouverture du mPTP ont été observées dans leur modèle. L'inhibition de l'ouverture du mPTP est probablement la conséquence d'une diminution de la surcharge calcique. Cette étude a reporté aussi une reprise rapide de la respiration spontanée après TLV avec un taux minime de traumatisme pulmonaire (Tissier et al. 2009). Plus récemment, il a été démontré sur des cardiomyocytes de souris que l'hypothermie (32°C) entraînait une réduction de la mort cellulaire. Cela a été corrélé à une augmentation de la phosphorylation du Akt et de HSP27 "*heat shock protein 27*". Une augmentation de la synthèse du NO a été observée dans ce modèle ainsi qu'une réduction de la libération des radicaux libres (ROS). Cette atténuation du ROS a été inhibée en inhibant Akt et la NO synthase. De plus, un maintien de la DeltaPsi_m (un indice de la magnitude de la membrane mitochondriale interne) a été remarqué en soumettant les cardiomyocytes à l'hypothermie (Shao et al. 2010). Même si l'effet cardioprotecteur de l'hypothermie est bien démontré expérimentalement, son application clinique semble improbable en dehors des patients chez qui l'infarctus se compliquerait d'un arrêt cardiaque.

Sur le plan pharmacologique, l'identification de plusieurs nouvelles voies de signalisation et protéines impliquées dans la physiopathologie des lésions de reperfusion a permis de développer ou d'identifier de nombreux agents pharmacologiques qui peuvent limiter la survenue des ces lésions.

Au niveau de la mitochondrie, il a été démontré que l'inhibition de l'ouverture du mPTP était une étape majeure dans la cardioprotection contre les lésions de reperfusion, et que la GSK-3 β dans sa forme inhibée inhibait l'ouverture de ce pore. À côté de ce qui a été démontré jusqu'à présent comme agents permettant l'inhibition de la GSK-3 β d'une façon directe ou indirecte par l'intermédiaire de la voie RISK, d'autres agents peuvent inhiber l'ouverture de ce pore sans passer par la GSK-3 β . La TRO40303 ayant une affinité vers le tissu cardiaque agit en se liant au translocateur mitochondrial (TSPO) (Schaller et al. 2010). Le mécanisme par lequel la TRO40303 inhibe l'ouverture du mPTP n'est pas identifié. La TSPO, cible de la TRO40303, est une protéine localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Elle forme des complexes avec d'autres protéines telles que la VDAC et l'ANT. Elle est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires y compris la prolifération et l'apoptose (Ostuni et al. 2009). Dans l'étude de Schaller et al. la TRO40303 administrée avant la reperfusion dans un modèle d'IDM chez le rat *in vivo*, entraînait une réduction de la taille d'infarctus corrélée à une réduction de l'apoptose. Son effet bénéfique passerait aussi par une diminution de la production des radicaux libres (Schaller et al. 2010). Si d'autres études expérimentales confirmaient sa sécurité d'emploi, cette molécule pourrait avoir un avenir dans la prise en charge des lésions de reperfusion.

Concernant la cascade en amont de la GSK-3, la Pim-1 a été détectée récemment comme un sous effecteur de l'Akt. La Pim-1 fait partie de la famille des trois sérine/thréonine kinases qui appartiennent au groupe des kinases dépendant de la calmoduline (Pim-1, Pim-2 et Pim-3, les deux dernières étant moins exprimées dans le cœur). Contrairement aux autres kinases (Akt, MAPK, PKC), l'activité de la Pim-1 n'est pas régulée par une kinase upstream. Elle est active sous sa forme initiale et son activité est régulée par des phénomènes de transcription génétique, de translocation de mARN et de dégradation protéiques. En générale, l'augmentation de l'expression de Pim-1 augmente la survie cellulaire et sa diminution induit l'apoptose. L'expression de la Pim-1 a été observée au niveau des cardiomyocytes post-natales

des souris, une diminution de cette expression est constatée dans les quelques semaines qui suivent la naissance. Chez l'adulte une induction de l'expression du Pim-1 est observée en réponse à un état pathologique, comme par exemple l'ischémie myocardique, avec une accumulation au niveau de la zone à risque. Une déplétion génétique de la Pim-1 a rendu les souris plus susceptibles à l'infarctus malgré une augmentation significative de l'expression et la phosphorylation d'Akt (Muraski et al. 2007). Plus récemment, l'augmentation de l'expression de la Pim-1 dans des cardiomyocytes a été corrélée à une augmentation du taux du Bcl-X et du Bcl-2 anti-apoptotiques (Borillo et al. 2010). Bien que des études supplémentaires étudiant le rôle de la Pim-1 dans la prévention des lésions de reperfusion indépendamment d'Akt soient nécessaires, Pim-1 est une cible pharmacologique intéressante.

Le réticulum endoplasmique (RE) est une autre structure affectée par l'I/R (Martindale et al. 2006). Il est le site de synthèse et de repliement des protéines, du stockage du calcium et de la biosynthèse des lipides et des stérols. Le stress du RE résulte de la perturbation de l'une de ces fonctions. L'accumulation des protéines non-repliées dans la lumière du RE est une caractéristique en commun observée dans toutes les perturbations (Schröder. 2008). Les protéines non-repliées, ayant un site hydrophobique, peuvent inter-agir avec les autres protéines et inhiber leur fonction. De plus, ces protéines peuvent adhérer à la membrane cellulaire et altérer le gradient ionique. L'altération du gradient calcique par exemple entraîne un échappement calcique du RE, une inhibition du repliement des autres protéines et donc une accélération de l'accumulation des protéines non-repliées.

L'homéostasie du repliement des protéines est assurée par des chaperones. Il existe trois groupes hiérarchiques de chaperones ; le premier groupe (les chaperones HSP70 ou BiP) agit sur des peptides non-repliés, les deux autres groupes (les chaperones HSP90 ou GRP94 et les chaperones lectines) agissent sur des protéines partiellement repliées. Selon leur mécanisme ces chaperones sont classées en chaperones foldases ou holdases. Les HSP70 sont des chaperones foldases qui activent le repliement des protéines. Les HSP90 agissent après le HSP70, ce sont des chaperones holdases qui se lient à des protéines semi-repliées sans activer le processus de repliement. Quand les chaperones foldases sont dépassés, les chaperones holdases captent les protéines pour les libérer une fois l'équilibre rétabli,

ce sont des "chaperones tampons". Le troisième groupe est formé des chaperones foldases. Il induit alors le repliement des protéines. La réponse du RE à l'accumulation des protéines non-repliées s'appelle URP "*Unfolded protein response*". Si la capacité du RE est dépassée suite à un état pathologique, une accumulation excessive des protéines non-repliées aura lieu dans le RE. Il existe deux systèmes qui permettent de cliver ces protéines non-repliées : la retrotranslocation suivie d'une dégradation protéosomale (le ERAD "*ER-associated protein degradation*"), et l'autophagie "*self eating*" (Schröder. 2008). Dans le processus d'autophagie une membrane de phagophore ou d'isolation se forme, englobe les particules étrangères, les fusionne en lysosome ou vacuole puis les dégrade.

L'I/R active la réponse de non repliement protéique ou l'URP au niveau du RE. La contribution du URP dans les lésions d'I/R a été étudiée dans plusieurs études expérimentales qui ont montré l'effet protecteur de l'activation du URP, en utilisant des souris transgéniques ayant une surexpression de l'URP du RE (Martindale et al. 2006 ; Cook et al. 2009). Dans certaines pathologies l'accumulation des protéines non-repliées est majorée ou parfois persistante et dépasse la capacité d'auto-rétablissement. Si le stress n'est pas rétabli, le RE commence à produire des facteurs pro-apoptotiques (caspases 12 ou autres) et la cellule entre en apoptose (Liu et al. 2008). Des chaperones pharmacologiques tels que l'acide tauroursodeoxycholique (TUDCA) et l'acide 4-phényle butyrique ont été identifiées. Ils permettent la stabilisation de la conformation des protéines et favorisent un repliement protéique approprié (Williams et al. 2010). Leur effet cardioprotecteur n'a pas été largement étudié. L'effet anti-apoptotique de la TUDCA a été récemment démontré dans un modèle d'IDM chez le rat (Rivard et al. 2007). Dans cette étude la TUDCA administrée avant l'induction de l'ischémie a entraîné une réduction de l'activité de la caspase 3. Des études supplémentaires sont nécessaires pour tester l'effet des chaperones pharmacologiques sur les voies de survie cellulaire après un IDM.

Dans certaines pathologies comme le diabète, un stress du RE excessif contribuerait à l'absence de cardioprotection induite par des agents connus pour leur effet cardioprotecteur contre les lésions d'I/R (Miki et al. 2009). L'importance d'inhiber le stress du RE dans les pathologies qui induisent un stress intense semble être nécessaire pour restaurer l'effet des moyens cardioprotecteurs.

Il a été démontré qu'il existait des structures faisant le lien entre le RE et la mitochondrie (Giorgi et al. 2009). Étant donné l'implication de cette dernière dans les lésions d'I/R, il est important de savoir si le maintien d'un bon fonctionnement mitochondrial peut assurer un bon fonctionnement du RE, si à l'inverse un bon fonctionnement du RE protège la mitochondrie, ou enfin s'il faut agir au niveau de ces deux structures en même temps pour obtenir une cardioprotection optimale.

À côté de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique, les jonctions intercellulaires "*gap junction*" semble avoir un rôle dans le mécanisme de la cardioprotection contre les lésions de reperfusion (Garcia-Dorado et al. 2002). Les jonctions intercellulaires sont formées des canaux permettant la connection entre deux cellules adjacentes, chaque canal étant formé de deux semi-canaux au niveau de chaque cellule. La régulation des jonctions intercellulaires se fait par les connexines (Cx). Le mécanisme exact de cette régulation n'est pas identifié. Plusieurs types de connexines existent, le plus répandu au niveau des cardiomyocytes est la Cx43 (van Veen et al. 2001). La phosphorylation de Cx43 par les différentes protéines kinases incluant la MAPK, p38 et PKG réduit les communications jonctionnelles et la déphosphorylation les augmente.

Les jonctions intercellulaires permettent une propagation électrique et moléculaire. Deux caractéristiques se distinguent : la conductance jonctionnelle et la perméabilité jonctionnelle. Quand le myocarde est soumis à une ischémie prolongée, la propagation électrique entre les cardiomyocytes diminue progressivement puis elle s'inhibe, les arythmies ventriculaires apparaissent. Ce phénomène est aussi associé à l'apparition des hypercontractures. Il a été démontré dans un modèle de cardiomyocytes isolés que les changements cellulaires après une ischémie (augmentation du Ca^{2+} , acidose, déplétion en ATP, accumulation des catabolites) sont à l'origine de l'inhibition de la conductance (Dhein et al. 1998). En ce qui concerne la perméabilité des jonctions cellulaires peu des données sont disponibles. Il est établi que les jonctions intercellulaires sont impliquées dans la propagation des hypercontractures durant l'I/R. Le passage de Na^+ via les jonctions d'une cellule en hypercontracture à une autre, et l'échange du Ca^{2+} qui s'en suit, peut être à l'origine de la propagation des hypercontractures (Ruiz-Meana et al. 1999). Dans ce cadre l'inhibition des jonctions cellulaires pourrait être une cible pour la cardioprotection. L'implication des jonctions cellulaires dans le développement des lésions d'I/R n'est

pas clairement identifiée. Elles peuvent être impliquées dans la propagation de ces lésions d'une cellule à une autre et donc augmenter l'étendue de l'agression, mais elles peuvent aussi atténuer les lésions au niveau d'une cellule soumise à une agression sévère.

Les données sur l'implication des jonctions intercellulaires dans le mécanisme des interventions cardioprotectrices sont limitées. Leur implication a été étudiée dans le mécanisme d'action du préconditionnement ischémique. Le préconditionnement induit la phosphorylation de la PKC ϵ et de la PKG qui entraînent la phosphorylation de la Cx43 et donc l'inhibition des jonctions intercellulaires (Miura et al. 2010). Plusieurs investigations sont encore nécessaires pour évaluer le rôle de ces jonctions et pour identifier les moyens permettant leur modulation.

Les lésions de reperfusion résultent de mécanismes complexes multifactoriels. Il n'existe actuellement aucun traitement validé applicable en routine clinique capable de réduire efficacement ces lésions de reperfusion. Nous avons vu qu'il existait de nombreuses pistes. Nombre d'entre elles serviront à valider des concepts avec comme objectif final, la mise au point d'agents pharmacologiques susceptibles de réduire la morbi-mortalité imputable aux lésions de reperfusion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abbott RD, Donahue RP, Kannel WB, Wilson PW. **The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. The Framingham Study.** JAMA. 1988 Dec 16;260(23):3456-60.
- Abdallah Y, Gkatzoflia A, Gligorievski D, Kasseckert S, Euler G, Schlüter KD, Schäfer M, Piper HM, Schäfer C. **Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca²⁺ storage.** Cardiovasc Res. 2006 May 1;70(2):346-53.
- Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, Boyle JR, Varty K, Kharbanda RK, Dutka DP, Gaunt ME. **Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial.** Circulation. 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I98-105.
- Amour J, Brzezinska AK, Jager Z, Sullivan C, Weihrauch D, Du J, Vladic N, Shi Y, Warltier DC, Pratt PF Jr, Kersten JR. **Hyperglycemia adversely modulates endothelial nitric oxide synthase during anesthetic preconditioning through tetrahydrobiopterin- and heat shock protein 90-mediated mechanisms.** Anesthesiology. 2010 Mar;112(3):576-85.
- Anderson SE, Liu H, Beyschau A, Cala PM. **Effects of cold cardioplegia on pH, Na, and Ca in newborn rabbit hearts.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Mar;290(3):H1090-7.
- Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, Font G, Piroth Z, Fontos G, Juhasz ED, Szekely L, Szelid Z, Turner MS, Ashrafian H, Frenneaux MP, Andreka P. **Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs.** Heart. 2007 Jun;93(6):749-52.

- Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. **Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury.** J Mol Cell Cardiol. 2005 Feb;38(2):367-74.
- Argaud L, Ovize M. **How to use the paradigm of ischemic preconditioning to protect the heart?** Med Sci (Paris). 2004 May;20(5):521-5.
- Avellanal M, Rodriguez P, Barrigon S. **Protective effects of cyclopiazonic acid on ischemia-reperfusion injury in rabbit hearts.** J Cardiovasc Pharmacol. 1998 Nov;32(5):845-51.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenstein JD. **Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death.** Nature. 2005 Mar 31;434(7033):658-62.
- Baker JE, Kozik D, Hsu AK, Fu X, Tweddell JS, Gross GJ. **Darbepoetin alfa protects the rat heart against infarction: dose-response, phase of action, and mechanisms.** J Cardiovasc Pharmacol. 2007 Jun;49(6):337-45.
- Bates E, Bode C, Costa M, Gibson CM, Granger C, Green C, Grimes K, Harrington R, Huber K, Kleiman N, Mochly-Rosen D, Roe M, Sadowski Z, Solomon S, Widimsky P. **Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction.** Circulation. 2008 Feb 19;117(7):886-96.
- Bell RM, Yellon DM. **Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS.** J Mol Cell Cardiol. 2003 Feb;35(2):185-93.

- Belosjorow S, Bolle I, Duschin A, Heusch G, Schulz R. **TNF-alpha antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Mar;284(3):H927-30.
- Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. **Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice.** Circ Res. 2008 Jan 4;102(1):131-5.
- Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. **The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure.** Pharmacol Ther. 2008 Nov;120(2):172-85.
- Bolli R. **The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase: an overview.** Basic Res Cardiol. 1996 Jan-Feb;91(1):57-63.
- Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. **Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes.** Biochem Biophys Res Commun. 1991 Sep 16;179(2):798-803.
- Borillo GA, Mason M, Quijada P, Völkers M, Cottage C, McGregor M, Din S, Fischer K, Gude N, Avitabile D, Barlow S, Alvarez R, Truffa S, Whittaker R, Glassy MS, Gustafsson AB, Miyamoto S, Glembotski CC, Gottlieb RA, Brown JH, Sussman MA. **Pim-1 kinase protects mitochondrial integrity in cardiomyocytes.** Circ Res. 2010 Apr 16;106(7):1265-74.
- Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bøttcher M, Køltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S, Lassen JF, Christiansen EH, Krusell LR, Kristensen SD, Thuesen L, Nielsen SS, Rehling M, Sørensen HT, Redington AN, Nielsen TT. **Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial.** Lancet. 2010 Feb 27;375(9716):727-34.

- Braunwald E, Kloner RA. **The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction.** *Circulation.* 1982 Dec;66(6):1146-9.
- Braunwald E. **Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded?** *Circulation.* 1989 Feb;79(2):441-4.
- Brines M, Cerami A. **Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise.** *Kidney Int.* 2006 Jul;70(2):246-50.
- Bugge E, Ytrehus K. **Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart--a protective additive to ischaemic preconditioning.** *Cardiovasc Res.* 1995 Feb;29(2):269-74.
- Bullard AJ, Govewalla P, Yellon DM. **Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo.** *Basic Res Cardiol.* 2005 Sep;100(5):397-403.
- Bullard AJ, Yellon DM. **Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro.** *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005 Oct;19(5):333-6.
- Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. **Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase.** *Cardiovasc Res.* 2006 Oct 1;72(1):51-9.
- Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. **Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling.** *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(6):855-69.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. **Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury.** *Circulation.* 2003 Jul 8;108(1):79-85.

- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. **Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 15;100(8):4802-6.
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM. **Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia.** J Mol Cell Cardiol. 1985 Feb;17(2):145-52.
- Chan CY, Chen YS, Lee HH, Huang HS, Lai YL, Chen CF, Ma MC. **Erythropoietin protects post-ischemic hearts by preventing extracellular matrix degradation: role of Jak2-ERK pathway.** Life Sci. 2007 Aug 9;81(9):717-23.
- Charlton B, Bacelj A, Slattery RM, Mandel TE. **Cyclophosphamide-induced diabetes in NOD/WEHI mice. Evidence for suppression in spontaneous autoimmune diabetes mellitus.** Diabetes. 1989 Apr;38(4):441-7.
- Chen Z, Li T, Zhang B. **Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts.** J Surg Res. 2008 Apr;145(2):287-94.
- Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, Shimizu M, Frndova H, Li J, Holtby HM, Cox PN, Smallhorn JF, Van Arsdell GS, Redington AN. **Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans.** J Am Coll Cardiol. 2006 Jun 6;47(11):2277-82.
- Churchill EN, Szweda LI. **Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function.** Arch Biochem Biophys. 2005 Jul 15;439(2):194-9.

- Clarke SJ, McStay GP, Halestrap AP. **Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A.** J Biol Chem. 2002 Sep 20;277(38):34793-9.
- Collins J, Pien FD, Houk JH. **Insulin-dependent diabetes mellitus associated with pentamidine.** Am J Med Sci. 1989 Mar;297(3):174-5.
- Cook AR, Bardswell SC, Pretheshan S, Dighe K, Kanaganayagam GS, Jabr RI, Merkle S, Marber MS, Engelhardt S, Avkiran M. **Paradoxical resistance to myocardial ischemia and age-related cardiomyopathy in NHE1 transgenic mice: a role for ER stress?** J Mol Cell Cardiol. 2009 Feb;46(2):225-33.
- Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. **Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria.** Circ Res. 2005 Aug 19;97(4):329-36.
- Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukhiv K, West IC, Garlid KD. **The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition.** J Biol Chem. 2006 Jul 28;281(30):20801-8.
- Costa AD, Pierre SV, Cohen MV, Downey JM, Garlid KD. **cGMP signalling in pre- and post-conditioning: the role of mitochondria.** Cardiovasc Res. 2008 Jan 15;77(2):344-52.
- Crabtree GR. **Calcium, calcineurin, and the control of transcription.** J Biol Chem. 2001 Jan 26;276(4):2313-6.
- Crompton M. **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death.** Biochem J. 1999 Jul 15;341 (Pt 2):233-49.
- Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. **Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial**

infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Oct;289(4):H1618-26.

Das M, Das DK. **Molecular mechanism of preconditioning.** IUBMB Life. 2008 Apr;60(4):199-203.

Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. **Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection.** Int J Biochem Cell Biol. 2006 Mar;38(3):414-9.

del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, Hajjar RJ. **Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 13;101(15):5622-7.

Deuchar GA, Opie LH, Lecour S. **TNFalpha is required to confer protection in an in vivo model of classical ischaemic preconditioning.** Life Sci. 2007 Apr 10;80(18):1686-91.

Dhein S. **Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation.** Trends Pharmacol Sci. 1998 Jun;19(6):229-41.

Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. **Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin.** Mol Cell. 2005 Jul 22;19(2):159-70.

Dow J, Kloner RA. **Postconditioning does not reduce myocardial infarct size in an in vivo regional ischemia rodent model.** J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2007 Jun;12(2):153-63.

Dumas JF, Simard G, Flamment M, Ducluzeau PH, Ritz P. **Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of**

insulin resistance in humans? Diabetes Metab. 2009 Jun;35(3):159-67.

Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sir  n AL. **Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.** Mol Med. 2002 Aug;8(8):495-505.

Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. **Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning.** Pharmacol Rev. 2007 Dec;59(4):418-58..

Ferrario M, Arbustini E, Massa M, Rosti V, Marziliano N, Raineri C, Campanelli R, Bertoletti A, De Ferrari GM, Klersy C, Angoli L, Bramucci E, Marinoni B, Ferlini M, Moretti E, Raisaro A, Repetto A, Schwartz PJ, Tavazzi L. **High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: A pilot, randomised, placebo-controlled study.** Int J Cardiol. 2009 Nov 9.

Fisher JW. **Erythropoietin: physiology and pharmacology update.** Exp Biol Med (Maywood). 2003 Jan;228(1):1-14.

Flaherty JD, Davidson CJ. **Diabetes and coronary revascularization.** JAMA. 2005 Mar 23;293(12):1501-8.

Flaherty MP, Guo Y, Tiwari S, Rezazadeh A, Hunt G, Sanganalmath SK, Tang XL, Bolli R, Dawn B. **The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning.** J Mol Cell Cardiol. 2008 Dec;45(6):735-41.

- Frias MA, Rebsamen MC, Gerber-Wicht C, Lang U. **Prostaglandin E2 activates Stat3 in neonatal rat ventricular cardiomyocytes: A role in cardiac hypertrophy.** Cardiovasc Res. 2007 Jan 1;73(1):57-65.
- Fuglestad BN, Suleman N, Tiron C, Kanhema T, Lacerda L, Andreassen TV, Sack MN, Jonassen AK, Mjøs OD, Opie LH, Lecour S. **Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in the cardioprotective signalling pathway activated by insulin therapy at reperfusion.** Basic Res Cardiol. 2008 Sep;103(5):444-53.
- Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. **Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm.** Eur J Cardiothorac Surg. 2004 Jun;25(6):1006-10.
- Gallagher KP, Buda AJ, Pace D, Gerren RA, Schlafer M. **Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarction in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion.** Circulation. 1986 May;73(5):1065-76.
- Gao E, Boucher M, Chuprun JK, Zhou RH, Eckhart AD, Koch WJ. **Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jul;293(1):H60-8.
- Gao Q, Zhang SZ, Cao CM, Bruce IC, Xia Q. **The mitochondrial permeability transition pore and the Ca²⁺-activated K⁺ channel contribute to the cardioprotection conferred by tumor necrosis factor- α .** Cytokine. 2005 Dec 7;32(5):199-205.
- Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E. **Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis?** Circ Res. 1996 Mar;78(3):455-65.

- Garcia-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, Solares J, Lidon RM, Blanco J, Puigfel Y, Piper HM, Soler-Soler J. **Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na(+)-H+ exchange.** Cardiovasc Res. 1997 Jul;35(1):80-9.
- Garcia-Dorado D, Oliveras J. **Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury?** Cardiovasc Res. 1993 Sep;27(9):1555-63.
- Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Rodriguez-Sinovas A, Mirabet M. **Gap junction-mediated intercellular communication in ischemic preconditioning.** Cardiovasc Res. 2002 Aug 15;55(3):456-65.
- Garcia-Dorado D, Théroux P, Munoz R, Alonso J, Elizaga J, Fernandez-Avilés F, Botas J, Solares J, Soriano J, Duran JM. **Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size.** Am J Physiol. 1992 Jan;262(1 Pt 2):H17-22.
- Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. **Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue.** Circulation. 1996 Nov 1;94(9):2193-200.
- Giorgi C, De Stefani D, Bononi A, Rizzuto R, Pinton P. **Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum.** Int J Biochem Cell Biol. 2009 Oct;41(10):1817-27.
- Gomez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M. **Inhibition of GSK3beta by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion.** Circulation. 2008 May 27;117(21):2761-8.
- Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. **Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following**

acute myocardial infarction in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Sep;293(3):H1654-61.

Griffiths EJ, Halestrap AP. **Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion.** Biochem J. 1995 Apr 1;307 (Pt 1):93-8.

Grinstein S, Woodside M, Sardet C, Pouyssegur J, Rotin D. **Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter during cell volume regulation. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism.** J Biol Chem. 1992 Nov 25;267(33):23823-8.

Gross ER, Gross GJ. **Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning.** Cardiovasc Res. 2006 May 1;70(2):212-21.

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. **Diabetes abolishes morphine-induced cardioprotection via multiple pathways upstream of glycogen synthase kinase-3beta.** Diabetes. 2007 Jan;56(1):127-36.

Gross ER, Hsu AK, Gross GJ. **The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 beta.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Aug;291(2):H827-34.

Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Lifschitz-Mercer B, Berger E, Paz Y, Matsa M, Kramer A, Mohr R. **Anti-tumor necrosis factor-alpha improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion.** J Am Coll Cardiol. 1997 Nov 15;30(6):1554-61.

Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabejdar-Maralani P, Sadeghipour H, Ebrahimi F, Dehpour AR. **Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart.** Eur J Pharmacol. 2008 Jan 28;579(1-3):246-52.

- Hanlon PR, Fu P, Wright GL, Steenbergen C, Arcasoy MO, Murphy E. **Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling.** FASEB J. 2005 Aug;19(10):1323-5.
- Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, Ashley E, Vichare S, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Keogh B, MacAllister RJ, Yellon DM. **Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial.** Lancet. 2007 Aug 18;370(9587):575-9.
- Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. **Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Feb;288(2):H971-6.
- Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. **The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning.** Trends Cardiovasc Med. 2005 Feb;15(2):69-75.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. **New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway.** Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):448-60.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. **Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application.** Cardiovasc Res. 2008 Aug 1;79(3):377-86.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. **Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection.** Heart Fail Rev. 2007 Dec;12(3-4):217-34.

- Hausenloy DJ, Yellon DM. **Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning.** Cardiovasc Res. 2006 May 1;70(2):240-53.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. **The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion.** J Mol Cell Cardiol. 2003 Apr;35(4):339-41.
- Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. **Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release.** J Mol Cell Cardiol. 1973 Aug;5(4):395-407.
- Heidbreder M, Naumann A, Tempel K, Dominiak P, Dendorfer A. **Remote vs. ischaemic preconditioning: the differential role of mitogen-activated protein kinase pathways.** Cardiovasc Res. 2008 Apr 1;78(1):108-15.
- Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. **Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium.** Am J Pathol. 1995 Feb;146(2):419-28.
- Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Myoishi M, Tsukamoto O, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Shiraga M, Kitakaze M, Hori M. **Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs.** J Am Coll Cardiol. 2006 Jul 4;48(1):176-84.
- Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Fujita M, Tsukamoto O, Wakeno M, Myoishi M, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. **Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts.** Cardiovasc Drugs Ther. 2005 Jan;19(1):33-40.

- Hoole SP, Heck PM, Sharples L, Khan SN, Duehmke R, Densem CG, Clarke SC, Shapiro LM, Schofield PM, O'Sullivan M, Dutka DP. **Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: a prospective, randomized control trial.** *Circulation*. 2009 Feb 17;119(6):820-7.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. **Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.** *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):683-9.
- Isomaa B. **A major health hazard: the metabolic syndrome.** *Life Sci*. 2003 Sep 26;73(19):2395-411.
- Ito H. **No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Sep;3(9):499-506.
- Jaburek M, Costa AD, Burton JR, Costa CL, Garlid KD. **Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes.** *Circ Res*. 2006 Oct 13;99(8):878-83.
- Jennings RB, Reimer KA. **Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood.** *Circulation*. 1983 Aug;68(2 Pt 2):I25-36.
- Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. **Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.** *Arch Pathol*. 1960 Jul;70:68-78.
- Jin ZQ, Karliner JS, Vessey DA. **Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation.** *Cardiovasc Res*. 2008 Jul 1;79(1):134-40.

- Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. **Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase.** *Circ Res.* 1984 Mar;54(3):277-85.
- Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. **Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore.** *J Clin Invest.* 2004 Jun;113(11):1535-49.
- Kaygisiz Z, Erkasap N, Yazihan N, Sayar K, Ataoglu H, Uyar R, Ikizler M. **Erythropoietin changes contractility, cAMP, and nitrite levels of isolated rat hearts.** *J Physiol Sci.* 2006 Jun;56(3):247-51.
- Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. **Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction.** *Anesthesiology.* 2002 Jan;96(1):183-8.
- Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J. **Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors.** *Basic Res Cardiol.* 2005 Sep;100(5):404-12.
- Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, Gross ER, Toller WG, Pagel PS, Warltier DC. **Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Apr;280(4):H1744-50.
- Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC. **Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Apr;278(4):H1218-24.

- Kharbanda RK, Nielsen TT, Redington AN. **Translation of remote ischaemic preconditioning into clinical practice.** Lancet. 2009 Oct 31;374(9700):1557-65.
- Kim HS, Cho JE, Hwang KC, Shim YH, Lee JH, Kwak YL. **Diabetes mellitus mitigates cardioprotective effects of remifentanyl preconditioning in ischemia-reperfused rat heart in association with anti-apoptotic pathways of survival.** Eur J Pharmacol. 2010 Feb 25;628(1-3):132-9.
- Kim JS, Kim J, Choi D, Lee CJ, Lee SH, Ko YG, Hong MK, Kim BK, Oh SJ, Jeon DW, Yang JY, Cho JR, Lee NH, Cho YH, Cho DK, Jang Y. **Efficacy of high-dose atorvastatin loading before primary percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation myocardial infarction: the STATIN STEMI trial.** JACC Cardiovasc Interv. 2010 Mar;3(3):332-9.
- Kim JS, Ohshima S, Pediaditakis P, Lemasters JJ. **Nitric oxide: a signaling molecule against mitochondrial permeability transition- and pH-dependent cell death after reperfusion.** Free Radic Biol Med. 2004 Dec 15;37(12):1943-50.
- Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. **Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor-kappa B translocation and TNF alpha release.** Shock. 2008 Jun;29(6):761-8.
- Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. **Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine.** Cardiovasc Res. 2005 Jul 1;67(1):124-33.
- Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. **Postconditioning attenuates myocardial**

ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. Cardiovasc Res. 2004 Apr 1;62(1):74-85.

Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, Seguchi O, Myoishi M, Minamino T, Ohara T, Nagai Y, Nanto S, Watanabe K, Fukuzawa S, Hirayama A, Nakamura N, Kimura K, Fujii K, Ishihara M, Saito Y, Tomoike H, Kitamura S; J-WIND investigators. **Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials.** Lancet. 2007 Oct 27;370(9597):1483-93.

Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, Stone GW. **Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial.** Eur Heart J. 2006 Oct;27(20):2400-5.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. **The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.** J Clin Invest. 1974 Dec;54(6):1496-508.

Kloner RA, Reimer KA, Willerson JT, Jennings RB. **Reduction of experimental myocardial infarct size with hyperosmolar mannitol.** Proc Soc Exp Biol Med. 1976 Apr;151(4):677-83.

Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E. **Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first?** Circulation. 1980 Nov;62(5):945-52.

Komamura K, Kitakaze M, Nishida K, Naka M, Tamai J, Uematsu M, Koretsune Y, Nanto S, Hori M, Inoue M, et al. **Progressive decreases in coronary vein flow during reperfusion in acute myocardial infarction: clinical documentation of the no reflow phenomenon after successful thrombolysis.** J Am Coll Cardiol. 1994 Aug;24(2):370-7.

- Konstantinov IE, Arab S, Li J, Coles JG, Boscarino C, Mori A, Cukerman E, Dawood F, Cheung MM, Shimizu M, Liu PP, Redington AN. **The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium.** J Thorac Cardiovasc Surg. 2005 Nov;130(5):1326-32.
- Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, Shimizu M, Stokoe J, Kharbanda RK, Redington AN. **Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism.** Transplantation. 2005 Jun 27;79(12):1691-5.
- Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, Nielsen-Kudsk JE, Schmidt MR, Redington AN, Nielsen TT, Bøtker HE. **Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Mar;288(3):H1252-6.
- Krug A, Du Mesnil de Rochemont, Korb G. **Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion.** Circ Res. 1966 Jul;19(1):57-62.
- Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. **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. 2000 May 9;97(10):5456-61.
- Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. **Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway.** Cardiovasc Res. 2009 Nov 1;84(2):201-8.

- Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM. **Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture.** *Circ Res.* 1997 Jan;80(1):69-75.
- Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. **Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange.** *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 2):H1531-9.
- Laskey WK, Yoon S, Calzada N, Ricciardi MJ. **Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a benefit of postconditioning.** *Catheter Cardiovasc Interv.* 2008 Aug 1;72(2):212-20.
- Laskey WK. **Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study.** *Catheter Cardiovasc Interv.* 2005 Jul;65(3):361-7.
- Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. **Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection.** *J Mol Cell Cardiol.* 2002 May;34(5):509-18.
- Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. **Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase).** *Circulation.* 2005 Dec 20;112(25):3911-8.
- Lecour S. **Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?** *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jul;47(1):32-40.

- Li CM, Zhang XH, Ma XJ, Luo M. **Limb ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia-reperfusion injury.** Scand Cardiovasc J. 2006 Oct;40(5):312-7.
- Lie RH, Stoettrup N, Sloth E, Hasenkam JM, Kroyer R, Nielsen TT. **Post-conditioning with cyclosporine A fails to reduce the infarct size in an in vivo porcine model.** Acta Anaesthesiol Scand. 2010 Apr 23.
- Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouysségur J, Pagès G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD. **MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo.** Circulation. 2004 Apr 27;109(16):1938-41.
- Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. **Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion.** J Cardiovasc Pharmacol. 2004 Oct;44(4):473-9.
- Liu HT, Zhang HF, Si R, Zhang QJ, Zhang KR, Guo WY, Wang HC, Gao F. **Insulin protects isolated hearts from ischemia/reperfusion injury: cross-talk between PI3-K/Akt and JNKs.** Sheng Li Xue Bao. 2007 Oct 25;59(5):651-9.
- Liu S, Wu XF, Zhang WZ, Sun YX, Cai SL. **Remote postconditioning by brief renal ischemia and reperfusion reduces acute myocardial ischemia and reperfusion induced myocardial apoptosis in rabbits.** Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi. 2007 Aug;35(8):757-60.
- Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. **Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion.** Life Sci. 2006 Apr 4;78(19):2255-64.

- Liu XH, Zhang ZY, Sun S, Wu XD. **Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress.** Shock. 2008 Oct;30(4):422-7.
- Lønborg J, Kelbaek H, Vejstrup N, Jørgensen E, Helqvist S, Saunamäki K, Clemmensen P, Holmvang L, Treiman M, Jensen JS, Engstrøm T. **Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance.** Circ Cardiovasc Interv. 2010 Feb 1;3(1):34-41.
- Ma X, Zhang X, Li C, Luo M. **Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction.** J Interv Cardiol. 2006 Oct;19(5):367-75.
- Maddock HL, Mocanu MM, Yellon DM. **Adenosine A(3) receptor activation protects the myocardium from reperfusion/reoxygenation injury.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Oct;283(4):H1307-13.
- Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, Fujiwara H, Sekikawa K, Seishima M. **Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha.** J Am Coll Cardiol. 2002 Apr 3;39(7):1229-35.
- Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, Copeland JG, Mathieu-Costello O. **Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon.** Am J Physiol. 1994 Apr;266(4 Pt 2):H1541-50.
- Manintveld OC, Te Lintel Hekkert M, van den Bos EJ, Suurenbroek GM, Dekkers DH, Verdouw PD, Lamers JM, Duncker DJ. **Cardiac effects of postconditioning depend critically on the duration of index ischemia.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Mar;292(3):H1551-60.

- Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA, Glembotski CC. **Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6.** *Circ Res.* 2006 May 12;98(9):1186-93.
- Massoudy P, Zahler S, Kupatt C, Reder E, Becker BF, Gerlach E. **Cardioprotection by cyclosporine A in experimental ischemia and reperfusion--evidence for a nitric oxide-dependent mechanism mediated by endothelin.** *J Mol Cell Cardiol.* 1997 Feb;29(2):535-44.
- Matsui T, Davidoff AJ. **Assessment of PI-3 kinase and Akt in ischemic heart diseases in diabetes.** *Methods Mol Med.* 2007;139:329-38.
- Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. **Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo.** *Circulation.* 2001 Jul 17;104(3):330-5.
- Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, Cung TT, Sportouch C, Angoulvant D, Finet G, André-Fouët X, Derumeaux G, Piot C, Vernhet H, Revel D, Ovize M. **Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol.* 2010 Mar 23;55(12):1200-5.
- Miki T, Miura T, Hotta H, Tanno M, Yano T, Sato T, Terashima Y, Takada A, Ishikawa S, Shimamoto K. **Endoplasmic reticulum stress in diabetic hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-glycogen synthase kinase-3beta-mediated suppression of mitochondrial permeability transition.** *Diabetes.* 2009 Dec;58(12):2863-72.
- Miura T, Miki T, Yano T. **Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Apr;298(4):H1115-25.

- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. **Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 30;100(20):11612-7.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, Coleman T, Brines M, Juhaszova M, Sollott SJ, Lakatta EG, Talan MI. **Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties.** J Pharmacol Exp Ther. 2006 Mar;316(3):999-1005.
- Moon C, Krawczyk M, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. **Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window.** Cardiovasc Drugs Ther. 2005 Aug;19(4):243-50.
- Muraski JA, Rota M, Misao Y, Fransioli J, Cottage C, Gude N, Esposito G, Delucchi F, Arcarese M, Alvarez R, Siddiqi S, Emmanuel GN, Wu W, Fischer K, Martindale JJ, Glembotski CC, Leri A, Kajstura J, Magnuson N, Berns A, Beretta RM, Houser SR, Schaefer EM, Anversa P, Sussman MA. **Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt.** Nat Med. 2007 Dec;13(12):1467-75.
- Murriel CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI, Mochly-Rosen D. **Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria.** J Biol Chem. 2004 Nov 12;279(46):47985-91.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** Circulation. 1986 Nov;74(5):1124-36.
- Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. **Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte.** Circulation. 1998 Apr 14;97(14):1392-400.

- Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. **Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase.** *Circulation*. 2001 Aug 28;104(9):979-81.
- Nikolaidis LA, Mankad S, Sokos GG, Miske G, Shah A, Elahi D, Shannon RP. **Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion.** *Circulation*. 2004 Mar 2;109(8):962-5.
- Ning XH, Chi EY, Buroker NE, Chen SH, Xu CS, Tien YT, Hyyti OM, Ge M, Portman MA. **Moderate hypothermia (30 degrees C) maintains myocardial integrity and modifies response of cell survival proteins after reperfusion.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2119-28.
- Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K. **Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Aug;291(2):H748-55.
- Nishihara M, Miura T, Miki T, Tanno M, Yano T, Naitoh K, Ohori K, Hotta H, Terashima Y, Shimamoto K. **Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3beta-mediated myocardial protection.** *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Nov;43(5):564-70.
- Nishino Y, Webb IG, Davidson SM, Ahmed AI, Clark JE, Jacquet S, Shah AM, Miura T, Yellon DM, Avkiran M, Marber MS. **Glycogen synthase kinase-3 inactivation is not required for ischemic preconditioning or postconditioning in the mouse.** *Circ Res*. 2008 Aug 1;103(3):307-14.

- Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. **Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction.** J Pharmacol Sci. 2006 May;101(1):31-9.
- Ohori K, Miura T, Tanno M, Miki T, Sato T, Ishikawa S, Horio Y, Shimamoto K. **Ser9 phosphorylation of mitochondrial GSK-3beta is a primary mechanism of cardiomyocyte protection by erythropoietin against oxidant-induced apoptosis.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Nov;295(5):H2079-86.
- Ostuni MA, Péranzi G, Ducroc RA, Fasseu M, Vidic B, Dumont J, Papadopoulos V, Lacapere JJ. **Distribution, pharmacological characterization and function of the 18 kDa translocator protein in rat small intestine.** Biol Cell. 2009 Jul 31;101(10):573-86.
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R.
POSTCONDITIONING AND PROTECTION FROM REPERFUSION INJURY : WHERE DO WE STAND? Cardiovasc Res. 2010 May 6.
- Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. **Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia.** Am J Physiol. 1997 Oct;273(4 Pt 2):H1707-12.
- Ozog MA, Bernier SM, Bates DC, Chatterjee B, Lo CW, Naus CC. **The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway.** Mol Biol Cell. 2004 Nov;15(11):4761-74.
- Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. **Cardioprotective effects of erythropoietin in**

the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):20655-62.

Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. **A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart.** J Clin Invest. 2003 Oct;112(7):999-1007.

Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. **Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity.** Cancer Res. 2005 Nov 15;65(22):10545-54.

Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. **Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism.** J Mol Cell Cardiol. 2002 Oct;34(10):1317-23.

Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. **Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels.** Am J Physiol. 1998 Nov;275(5 Pt 2):H1542-7.

Peralta C, Fernández L, Panés J, Prats N, Sans M, Piqué JM, Gelpí E, Roselló-Catafau J. **Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat.** Hepatology. 2001 Jan;33(1):100-13.

Petrishchev NN, Vlasov TD, Sipovsky VG, Kurapeev DI, Galagudza MM. **Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning?** Pathophysiology. 2001 Mar;7(4):271-274.

Pfeffer LM, Mullersman JE, Pfeffer SR, Murti A, Shi W, Yang CH. **STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1**

chain of the type I interferon receptor. Science. 1997 May 30;276(5317):1418-20.

Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. **Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction.** N Engl J Med. 2008 Jul 31;359(5):473-81.

Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. **A fresh look at reperfusion injury.** Cardiovasc Res. 1998 May;38(2):291-300.

Prunier F, Kawase Y, Gianni D, Scapin C, Danik SB, Ellinor PT, Hajjar RJ, Del Monte F. **Prevention of ventricular arrhythmias with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump overexpression in a porcine model of ischemia reperfusion.** Circulation. 2008 Aug 5;118(6):614-24.

Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. **Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jan;292(1):H522-9.

Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. **Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion.** Circulation. 1993 Mar;87(3):893-9.

Przyklenk K, Maynard M, Greiner D, Whittaker P. **Abstract 1905: Restoration of Normoglycemia Re-Establishes the Infarct-Sparing Effect of Postconditioning in Diabetic Mice.** Circulation 118: S_402-d-403S_ - d.

Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. **Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by**

triggering multiple signaling pathways. Basic Res Cardiol. 2005 May;100(3):187-97.

Raphael J, Gozal Y, Navot N, Zuo Z. **Hyperglycemia Inhibits Anesthetic-induced Postconditioning in the Rabbit Heart via Modulation of Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and Endothelial Nitric Oxide Synthase Signaling.** J Cardiovasc Pharmacol. 2010 Apr;55(4):348-57.

Reimer KA, Jennings RB. **The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow.** Lab Invest. 1979 Jun;40(6):633-44.

Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM. **Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection.** Trends Pharmacol Sci. 2008 May;29(5):258-67.

Rivard AL, Steer CJ, Kren BT, Rodrigues CM, Castro RE, Bianco RW, Low WC. **Administration of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) reduces apoptosis following myocardial infarction in rat.** Am J Chin Med. 2007;35(2):279-95.

Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys PR. **Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1.** Cardiovasc Res. 2005 Feb 15;65(3):719-27.

Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E, Agulló E, Garcia-Dorado D. **Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Oct;297(4):H1281-9.

Ruiz-Meana M, García-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Soler-Soler J. **Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated**

cardiomyocytes following transient metabolic inhibition.
Cardiovasc Res. 1995 Jul;30(1):64-9.

Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM, Soler-Soler J.
Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. Circ Res. 1999 Aug 6;85(3):280-7.

Sato T, O'Rourke B, Marbán E. **Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C.** Circ Res. 1998 Jul 13;83(1):110-4.

Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, Ostuni MA, Lacapere JJ, Bassissi F, Bordet T, Berdeaux A, Jones SP, Morin D, Pruss RM. **TRO40303 (3,5-seco-4-nor-cholestan-5-one oxime-3-ol), a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition.** J Pharmacol Exp Ther. 2010 Mar 9.

Schlüter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM. **Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors.** Am J Physiol. 1996 Aug;271(2 Pt 2):H428-34.

Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, White PA, Kristiansen SB, Sorensen K, Dzavik V, Redington AN, Kharbanda RK. **Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Apr;292(4):H1883-90.

Schoemaker RG, van Heijningen CL. **Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 May;278(5):H1571-6.

Schröder M. **Endoplasmic reticulum stress responses.** Cell Mol Life Sci. 2008 Mar;65(6):862-94.

- Schulz R, Heusch G. **Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction?** Circulation. 2009 Mar 17;119(10):1355-7.
- Seshadri G, Sy JC, Brown M, Dikalov S, Yang SC, Murthy N, Davis ME. **The delivery of superoxide dismutase encapsulated in polyketal microparticles to rat myocardium and protection from myocardial ischemia-reperfusion injury.** Biomaterials. 2010 Feb;31(6):1372-9.
- Shanmuganathan S, Hausenloy DJ, Duchen MR, Yellon DM. **Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jul;289(1):H237-42.
- Shao Z, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, Ramachandran S, Li J, Hamann KJ, Vanden Hoek TL. **Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Apr 9.
- Siegmund B, Zude R, Piper HM. **Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload.** Am J Physiol. 1992 Oct;263(4 Pt 2):H1262-9.
- Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. **Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue.** J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2004 Jun;9(2):83-90.
- Singh D, Chopra K. **Evidence of the role of angiotensin AT(1) receptors in remote renal preconditioning of myocardium.** Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2004 Mar;26(2):117-22.
- Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. **Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation.** Circ Res. 2009 Jan 2;104(1):15-8.

- Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, André-Fouët X, Ovize M. **Postconditioning the human heart.** *Circulation.* 2005 Oct 4;112(14):2143-8.
- Suh JW, Chung WY, Kim YS, Kim KI, Jeon EJ, Cho YS, Youn TJ, Chae IH, Kim CH, Choi DJ. **The effect of intravenous administration of erythropoietin on the infarct size in primary percutaneous coronary intervention.** *Int J Cardiol.* 2010 Mar 1.
- Suleman N, Somers S, Smith R, Opie LH, Lecour SC. **Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning.** *Cardiovasc Res.* 2008 Jul 1;79(1):127-33.
- Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. **Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *Apoptosis.* 2006 Sep;11(9):1583-93.
- Tanaka K, Kehl F, Gu W, Krolkowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. **Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jun;282(6):H2018-23.
- Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW. **Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1999 Mar;359(3):243-7.
- Thibault H, Piot C, Ovize M. **Postconditioning in man.** *Heart Fail Rev.* 2007 Dec;12(3-4):245-8.
- Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M. **Long-term benefit of postconditioning.** *Circulation.* 2008 Feb 26;117(8):1037-44.

- Thielmann M, Dörge H, Martin C, Belosjorow S, Schwanke U, van De Sand A, Konietzka I, Büchert A, Krüger A, Schulz R, Heusch G. **Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine.** *Circ Res.* 2002 Apr 19;90(7):807-13.
- Tissier R, Couvreur N, Ghaleh B, Bruneval P, Lidouren F, Morin D, Zini R, Bize A, Chenoune M, Belair MF, Mandet C, Douheret M, Dubois-Rande JL, Parker JC, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. **Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction.** *Cardiovasc Res.* 2009 Jul 15;83(2):345-53.
- Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. **The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts.** *Cardiovasc Res.* 1996 Apr;31(4):526-36.
- Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. **Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 5;308(4):990-4.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Carr RD, Yellon DM. **Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation.** *Diabetes.* 2005 Aug;54(8):2360-4.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. **Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway.** *Circ Res.* 2004 Aug 6;95(3):230-2.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. **Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jul;289(1):H2-7.

- Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB. **Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs.** *Circulation*. 1987 Jun;75(6):1237-48.
- Valen G, Vaage J. **Pre- and postconditioning during cardiac surgery.** *Basic Res Cardiol*. 2005 May;100(3):179-86.
- Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. **Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury.** *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Jun;40(6):846-52.
- van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. **Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jul 5;46(1):125-33.
- van der Meer P, Lipsic E. **Erythropoietin: repair of the failing heart.** *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jul 4;48(1):185-6.
- van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. **Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties.** *Cardiovasc Res*. 2001 Aug 1;51(2):217-29.
- Ventura-Clapier R et Lombès A. **Mitochondries et pathologies.** *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*, p. 241-252, Edition 2007.
- Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A, Di Salvo C, Kolvekar S, Yap J, Lawrence D, Bognolo J, Yellon DM. **Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with**

cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial. Heart. 2009 Oct;95(19):1567-71.

Vessey DA, Kelley M, Li L, Huang Y, Zhou HZ, Zhu BQ, Karliner JS. **Role of sphingosine kinase activity in protection of heart against ischemia reperfusion injury.** Med Sci Monit. 2006 Oct;12(10):BR318-24.

Vinten-Johansen J. **Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion.** Heart Fail Rev. 2007 Dec;12(3-4):235-44.

Wagner C, Kloeting I, Strasser RH, Weinbrenner C. **Cardioprotection by postconditioning is lost in WOKW rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta.** J Cardiovasc Pharmacol. 2008 Nov;52(5):430-7.

Wang Y, Takashi E, Xu M, Ayub A, Ashraf M. **Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial K(ATP) channels by diazoxide.** Circulation. 2001 Jul 3;104(1):85-90.

Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH. **Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway.** Cardiovasc Res. 2002 Aug 15;55(3):590-601.

Weinbrenner C, Schulze F, Sárváry L, Strasser RH. **Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart.** Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):591-9.

Werns SW, Shea MJ, Driscoll EM, Cohen C, Abrams GD, Pitt B, Lucchesi BR. **The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size. Reduction by superoxide dismutase but not catalase.** Circ Res. 1985 Jun;56(6):895-8.

- Williams B, Kabbage M, Britt R, Dickman MB. **AtBAG7, an Arabidopsis Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 30;107(13):6088-93.
- Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. **Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform.** Cardiovasc Res. 2002 Aug 15;55(3):583-9.
- Wright GL, Hanlon P, Amin K, Steenbergen C, Murphy E, Arcasoy MO. **Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury.** FASEB J. 2004 Jun;18(9):1031-3.
- Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ. **Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide.** Eur J Pharmacol. 2001 Sep 14;427(2):131-5.
- Xin P, Zhu W, Li J, Ma S, Wang L, Liu M, Li J, Wei M, Redington AN. **Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010 Jun;298(6):H1819-31.
- Xu YC, Xue FS, Liao X, Xiong J, Yang QY, Wang WL, Zhang YM. **Combined morphine and limb remote ischaemia postconditioning may produce an enhanced cardioprotection.** Med Hypotheses. 2009 Sep;73(3):302-5.
- Yamaguchi H, Wang HG. **The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change.** Oncogene. 2001 Nov 22;20(53):7779-86.

- Yang XC, Liu Y, Wang LF, Cui L, Wang T, Ge YG, Wang HS, Li WM, Xu L, Ni ZH, Liu SH, Zhang L, Jia HM, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. **Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention.** J Invasive Cardiol. 2007 Oct;19(10):424-30.
- Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. **Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation.** Basic Res Cardiol. 2005 Jan;100(1):57-63.
- Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. **Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways.** J Am Coll Cardiol. 2004 Sep 1;44(5):1103-10.
- Yellon DM, Baxter GF. **Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury?** Trends Cardiovasc Med. 1999 Nov;9(8):245-9.
- Yellon DM, Downey JM. **Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology.** Physiol Rev. 2003 Oct;83(4):1113-51.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. **Myocardial reperfusion injury.** N Engl J Med. 2007 Sep 13;357(11):1121-35.
- Yoshida H, Kusama Y, Kodani E, Yasutake M, Takano H, Atarashi H, Kishida H, Takano T. **Pharmacological preconditioning with bradykinin affords myocardial protection through NO-dependent mechanisms.** Int Heart J. 2005 Sep;46(5):877-87.
- Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. **Infarct-sparing effect of**

myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. Cardiovasc Res. 2006 May 1;70(2):315-24.

Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, Jiang R, Wang N, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Caffrey JL, Vinten-Johansen J. **Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008 Mar;294(3):H1444-51.

Zhao WS, Xu L, Wang LF, Zhang L, Zhang ZY, Liu Y, Liu XL, Yang XC, Cui L, Zhang L. **A 60-s postconditioning protocol by percutaneous coronary intervention inhibits myocardial apoptosis in patients with acute myocardial infarction.** Apoptosis. 2009 Oct;14(10):1204-11.

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. **Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Aug;285(2):H579-88.

Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, Vinten-Johansen J. **Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion.** Apoptosis. 2001 Aug;6(4):279-90.

Zweier JL. **Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury.** J Biol Chem. 1988 Jan 25;263(3):1353-7.

ANNEXES

Frederic Treguer, Erwan Donal, Sophie Tamareille, Nehmat Ghaboura, Geneviève Derumeaux, Alain Furber and Fabrice Prunier

Am J Physiol Heart Circ Physiol 298:1679-1686, 2010. First published Apr 2, 2010;
doi:10.1152/ajpheart.01058.2009

You might find this additional information useful...

This article cites 37 articles, 24 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/298/6/H1679#BIBL>

Updated information and services including high-resolution figures, can be found at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/298/6/H1679>

Additional material and information about *AJP - Heart and Circulatory Physiology* can be found at:

<http://www.the-aps.org/publications/ajpheart>

This information is current as of June 11, 2010 .

Speckle tracking imaging improves in vivo assessment of EPO-induced myocardial salvage early after ischemia-reperfusion in rats

Frederic Treguer,^{1,2} Erwan Donal,³ Sophie Tamareille,¹ Nehmat Ghaboura,¹ Geneviève Derumeaux,⁴ Alain Furber,^{1,2} and Fabrice Prunier^{1,2}

¹Protection et Remodelage du Myocarde, Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur 3860, Université d'Angers, Angers; ²Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, Angers; ³Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, Centre d'Investigation Clinique et d'Innovation Technologique 804, Laboratoire Traitement du Signal et de l'Image, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale U 642, Rennes; and ⁴Cardioprotection, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale U 886, Université Claude Bernard, Lyon, France

Submitted 6 November 2009; accepted in final form 29 March 2010

Treguer F, Donal E, Tamareille S, Ghaboura N, Derumeaux G, Furber A, Prunier F. Speckle tracking imaging improves in vivo assessment of EPO-induced myocardial salvage early after ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H1679–H1686, 2010. First published April 2, 2010; doi:10.1152/ajpheart.01058.2009.—A noninvasive assessment of infarct size and transmural extension of myocardial infarction (TEMI) is fundamental in experimental models of ischemia-reperfusion. Conventional echocardiography parameters are limited in this purpose. This study was designed to examine whether speckle tracking imaging can be used in a rat model of ischemia-reperfusion to accurately detect the reduction of infarct size and TEMI induced by erythropoietin (EPO) as early as 24 h after reperfusion. Rats were randomly assigned to one of three groups: myocardial infarction (MI)-control group, 45 min ischemia followed by 24 h of reperfusion; MI-EPO group, similar surgery with a single bolus of EPO administered at the onset of reperfusion; and sham-operated group. Short-axis two-dimensional echocardiography was performed after reperfusion. Global radial (GS_r) and circumferential (GS_{cir}) strains were compared with infarct size and TEMI assessed after triphenyltetrazolium chloride staining. As a result, ejection fraction, shortening fraction, GS_r , and GS_{cir} significantly correlated to infarct size, whereas only GS_r and GS_{cir} significantly correlated to TEMI. EPO significantly decreased infarct size (30.8 ± 3.5 vs. $56.2 \pm 5.7\%$ in MI-control, $P < 0.001$) and TEMI (0.37 ± 0.05 vs. 0.77 ± 0.05 in MI-control, $P < 0.001$). None of the conventional echocardiography parameters was significantly different between the MI-EPO and MI-control groups, whereas GS_r was significantly higher in the MI-EPO group (29.1 ± 4.7 vs. $16.4 \pm 3.3\%$ in MI-control; $P < 0.05$). Furthermore, GS_{cir} and GS_r appeared to be the best parameters to identify a TEMI >0.75 24 h after reperfusion. In conclusion, these findings demonstrate the usefulness of speckle tracking imaging in the early evaluation of a cardioprotective strategy in a rat model of ischemia-reperfusion.

echocardiography; myocardial infarction; cardioprotection; erythropoietin

THE PROMPT REPERFUSION OF ischemic myocardium is critical for salvaging the heart (6, 10, 20). However, the restoration of blood flow may have paradoxically deleterious consequences and lead to lethal myocardial ischemia-reperfusion injury (20). New cardioprotective strategies, aimed at limiting myocardial infarct size, are required to attenuate reperfusion injury and

improve outcomes. One of these newer cardioprotective approaches is the administration of erythropoietin (EPO) at the time of myocardial reperfusion (21). EPO has been shown to reduce myocardial infarct size, ventricular dysfunction, and apoptosis in numerous experimental studies (2, 3, 13, 16, 18, 19, 29, 33). Several ongoing clinical trials are now recruiting patients.

The rat model of left anterior descending coronary artery (LAD) ligation followed by reperfusion is commonly used in research focused on reperfusion injury. Transmural extension of the necrosis, a marker of viability, and infarct size are two major prognostic markers that must be accurately measured in this model. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining is the most commonly used method to measure infarct size and transmural extension of the necrosis early after reperfusion (35). As a final assessment, however, TTC staining cannot be used for longitudinal follow-up. Several noninvasive imaging techniques attempted to measure infarct size and viability in rodents: single-photon emission computed tomography (11, 36), positron emission tomography (27), magnetic resonance imaging (23, 32, 37), and contrast echocardiography (24). These options are not only invasive in nature as they require intravenous access and deep anesthesia, but, in addition, they are not widely available. In large animal and clinical studies, recent breakthroughs in echocardiographic tools have enabled regional myocardial deformation function to be quantified. The relevance of regional deformation in the assessment of infarct transmural extension was first reported in dogs using the radial transmural velocity gradient (8). More recently, strain rate derived from tissue-Doppler imaging has been reported to be a more accurate tool than conventional echocardiography in predicting transmural extension of necrosis in mice 24 h after LAD ligation (31). Speckle tracking imaging is a recently developed tool that tracks the interference patterns from subwavelength structures so as to characterize segmental muscle movement, while simultaneously measuring strain in two orthogonal directions from a single echocardiographic view. Speckle tracking is not constrained by the two major limitations of Doppler tissue imaging in the assessment of the strain rate: angle dependence and the ability to assess only one strain component at a time. Speckle tracking was carried out in a variety of clinical settings (1, 5, 9, 14), and its use was recently validated in rats, since it correctly identified segmental left ventricular (LV) dysfunction induced by scarring 4 to 10 wk following LAD ligation (15).

Address for reprint requests and other correspondence: F. Prunier, Protection et Remodelage du Myocarde, UPRES EA 3860, Faculté de Médecine, Rue Haute de Reculée, F-49045 Angers Cedex 1, France (e-mail: faprunier@chu-angers.fr).

Therefore, this study was designed to examine whether speckle tracking imaging can be used in a rat model of ischemia-reperfusion to accurately detect the reduction of infarct size and transmural extension of necrosis induced by EPO as early as 24 h after reperfusion.

MATERIALS AND METHODS

Wistar rats, 10 wk old, weighing ~200–250 g were used in this study. All animals were treated in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, Revised 1996). The protocol was approved by a regional Animal Care and Ethics Committee.

Myocardial Infarction Mode

Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg ip) and ventilated with an endotracheal tube (Series Small Animal Ventilator, SAR-830/P, CWE). Body core temperature was monitored during the surgical procedure with a rectal thermometer and maintained at 36–38°C, using a homeothermic blanket connected to a temperature control unit (HB101/2 RS, BIOSEB). Animal transmitters (CTA-F40 implant, DSI, St. Paul, MN) were implanted subcutaneously for ECG monitoring. A left thoracotomy was performed in the fifth intercostal space. After the removal of the pericardium to expose the heart, a 7-0 monofilament suture was placed around the proximal portion of the LAD. The ligature ends were passed through a small length of plastic tube to form a snare. For coronary artery occlusion, the snare was pressed onto the surface of the heart directly above the coronary artery. Ischemia was confirmed by blanching of the myocardium, dyskinesia of the ischemic region, and ST-segment elevation on the ECG. After 45 min of occlusion, reperfusion was achieved by loosening the snare and confirmed by a marked hyperemic response at reperfusion.

Experimental Protocol

Rats were randomly assigned to one of three groups: 1) myocardial infarction (MI)-control, ischemia-reperfusion with a single bolus of 500 μ l PBS administered intravenously at the onset of reperfusion; 2) MI-EPO, a single bolus of 1,000 IU/kg (equivalent to 5 μ g/kg) darbepoietin alpha (Aranesp, Amgen) diluted in 500 μ l PBS, administered intravenously at the onset of reperfusion (29); and 3) sham-operated group (same surgical procedure as the MI groups without tightening the snare). The rats were weaned off mechanical ventilation and returned to cages to recover. The rats were lightly reanesthetized with ketamine (60 mg/kg ip) 24 h after reperfusion for the echocardiography. In an additional substudy, rats from the MI-control and MI-EPO groups underwent the echographic analysis 7 days instead of 24 h after surgery. Following echography, all rats were euthanized under deep anesthesia.

Echocardiography

Echocardiography was performed using a commercially available ultrasound system (VIVID7, GE Medical Systems) equipped with a 10-MHz sectorial probe (10S). The chest was shaved, and the animal was positioned on a heating pad in a supine position. A single-channel electrocardiogram was obtained on the imaging system. All images were digitally stored on hard disks for off-line analysis (EchoPac Q-analysis software, GE-Medical). All acquisitions were performed by the same operator (F. Treguer), while off-line analysis was conducted by a well-trained investigator (G. Dermeaux) who was blinded to the allocated groups.

M-mode tracings were recorded from the parasternal short-axis view at the level of the papillary muscles with two-dimensional image guidance. Anterior wall (AW) and posterior wall (PW) thickness and

LV cavity diameters were measured as recommended by the American Society of Echocardiography (25). LV ejection fraction (EF) and LV shortening fraction (SF) were calculated from M-mode tracings.

Speckle tracking imaging was analyzed from a loop of two-dimensional images recorded in the parasternal short-axis view at the papillary muscle level with a frame rate of 196 images per second and a depth of 2 cm. During image analysis, the endocardial border was manually traced, and the region of interest width was manually adjusted so as to include the entire myocardium. The software automatically tracked and accepted segments of good tracking quality and rejected poorly tracked segments, while allowing the observer to adjust the segmental region of interest width. Global radial strain (GS_r) and global circumferential strain (GS_{cir}) were calculated by averaging, respectively, the radial and circumferential peak systolic strain values obtained in the six myocardial segments (anteroseptal, anterior, anterolateral, lateral, inferior, and inferoseptal) (Fig. 1).

Infarct Size and Transmurality Assessment

The rats were reanesthetized with pentobarbital sodium (100 mg/kg ip) following echocardiography. Heparin (1,500 IU/kg) was administered intravenously to prevent intracoronary clot formation. The heart was then removed, and the LAD was reoccluded using the 7-0 monofilament suture kept in place. The ascending aorta was retrogradely perfused *ex vivo* with Evans blue. The LV was sliced transversely from apex to base into five to six 1-mm slices using a coronal heart slicer matrix (Braintree Scientific). The slices were weighed and incubated in 1% TTC (Sigma) in a phosphate-buffered solution (pH 7.4) at 37°C for 20 min and then fixed in 10% formalin. Computerized planimetry (ImageJ software, NIH, Bethesda, MD) was used to determine the area at risk (AAR, nonblue) and the area of necrosis (AN, white area) from images of each section. AAR and AN were corrected for the weight of the section. The total weights of AAR and AN were calculated and expressed in grams and their percentage of the LV or AAR weight.

The degree of transmural extension of infarction was calculated from the slice encompassing the papillary muscles, as previously described (8, 31). The transmural extension of MI (TEMI) within the two lateral borders of the necrotic area was calculated. Four equidistant transmural radii were traced perpendicular to the endocardial and epicardial boundaries. On each radius, the ratio of the length of the infarct zone divided by the distance between the endocardial and epicardial borders was calculated. The TEMI was the mean value of the ratio of the four radii.

Statistical Analysis

All values were expressed as means \pm SE. Statistical analyses were performed using StatView 4.0 software. Between-group differences were evaluated using one-way ANOVA, followed by Student-Neuman-Keuls post hoc test. A *P* value <0.05 was considered statistically significant. Receiver operating characteristic curves (ROC, using SPSS software) were analyzed for EF, SF, GS_r , and GS_{cir} to determine the best echographic parameter for identifying transmural MI, which is defined as TEMI >0.75.

RESULTS

A 40% mortality rate was observed following surgery in both MI groups. In total, 26 rats were available for analysis 24 h after reperfusion (7 sham, 8 MI-control, and 11 MI-EPO). Two rats from the MI-EPO group were excluded from echographic analysis because of poor image quality. Twelve rats were used for the analysis 7 days after surgery (6 MI-control and 6 MI-EPO).

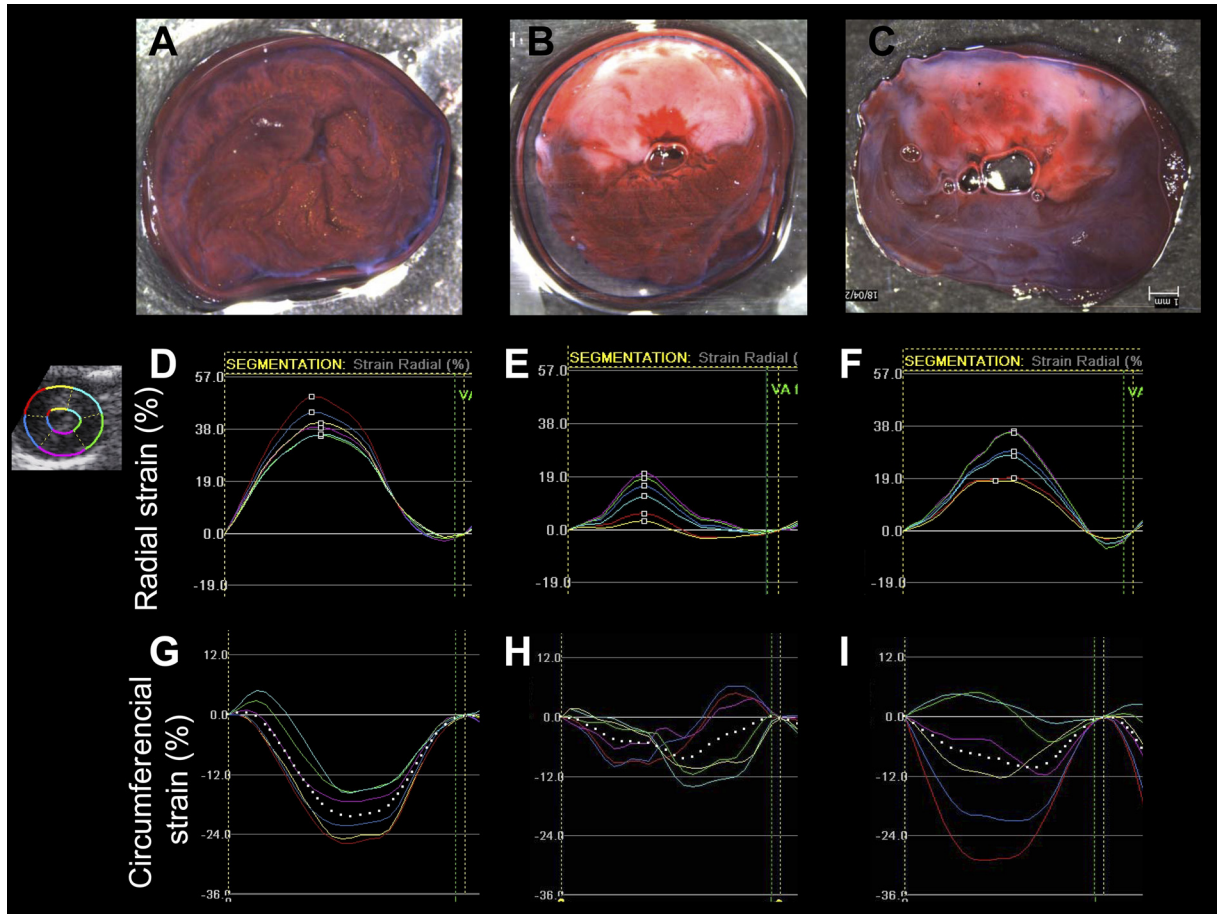


Fig. 1. Representative examples of radial and circumferential strains and left ventricular slices after triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining 24 h after surgery. A–C: examples of slices after TTC staining in sham-operated (A), myocardial infarction (MI)-control (B), and MI-erythropoietin (EPO) (C) groups. D–F: examples of segmental waveforms of systolic radial strain in sham-operated (D), MI-control (E), and MI-EPO (F) groups. G–I: examples of segmental waveforms of systolic circumferential strain curves in sham-operated (G), MI-control (H), and MI-EPO (I) groups. Colors represent anterior (yellow), lateral (cyan), posterior (green), inferior (magenta), septal (blue), and anteroseptal (red) walls.

Twenty-Four Hours After Reperfusion

EPO-induced cardioprotection. The area induced by LAD ligation (AAR/LV) did not differ between MI groups (MI-control, 34.0 ± 4.3 vs. MI-EPO, 32.4 ± 4.4%, not significant).

As expected, EPO treatment was associated with MI size reduction (AN/AAR, 56.2 ± 5.7 vs. 30.8 ± 3.5% in MI-control and MI-EPO, respectively, *P* < 0.001). EPO also reduced the transmural extension of the infarct (TEMI, 0.77 ± 0.05 vs. 0.37 ± 0.05 in MI-control and MI-EPO, respectively, *P* < 0.001).

Table 1. Echocardiographic data 24 h after surgery

	Sham	MI-Control	MI-EPO
<i>n</i>	7	8	9
Heart rate, beats/min	463 ± 14	475 ± 14	483 ± 8
Body weight, g	236.4 ± 4.0	236.1 ± 9.1	223.5 ± 5.9
LVEDD, mm	4.7 ± 0.2	5.5 ± 0.1*	5.1 ± 0.2
LVESD, mm	2.0 ± 0.1	3.5 ± 0.2*	3.0 ± 0.3*
AW thickening, %	68.9 ± 8.2	37.6 ± 10.8	41.6 ± 9.3
PW thickening, %	51.2 ± 8.0	60.5 ± 7.7	48.6 ± 5.4
LVEF, %	86.3 ± 3.9	69.5 ± 4.5*	76.4 ± 5.0
LVSF, %	57.0 ± 2.3	35.6 ± 3.6*	42.3 ± 3.8*
GS _r , %	38.1 ± 3.0	16.4 ± 3.3*	29.1 ± 4.7†
GS _{cir} , %	-18.4 ± 3.4	-7.7 ± 0.9*	-11.0 ± 1.1*

Values are means ± SE; *n*, number of rats. Sham, sham-operated rats; MI-control, myocardial infarction (MI) without erythropoietin (EPO); MI-EPO, MI with EPO injection; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; AW, anterior wall; PW, posterior wall; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVSF, left ventricular shortening fraction; GS_r, global radial strain; GS_{cir}, global circumferential strain. **P* < 0.05 vs. Sham value; †*P* < 0.05 vs. MI-control value.

Table 2. Regional strain values 24 h after surgery

	Sham	MI-Control	MI-EPO
Regional radial strain, %			
Anteroseptal	37.3 ± 3.3	13.0 ± 4.4*	24.5 ± 5.1
Anterior	37.7 ± 3.9	12.4 ± 3.5*	25.0 ± 4.7*†
Anterolateral	36.7 ± 3.3	15.8 ± 3.6*	29.0 ± 4.2†
Lateral	36.3 ± 3.0	19.0 ± 3.3*	32.4 ± 4.7†
Inferior	39.2 ± 6.2	20.6 ± 3.7*	34.8 ± 5.6
Inferoseptal	41.5 ± 7.1	17.4 ± 5.6*	29.3 ± 5.6
Regional circumferential strain, %			
Anteroseptal	-20.5 ± 5.9	-6.1 ± 1.0*	-8.3 ± 1.8*
Anterior	-20.0 ± 5.6	-4.4 ± 1.2*	-7.8 ± 1.1*
Anterolateral	-15.6 ± 4.4	-7.5 ± 1.1*	-9.4 ± 0.8*
Lateral	-15.4 ± 3.4	-10.3 ± 1.6	-12.8 ± 0.8
Inferior	-19.4 ± 2.9	-12.4 ± 1.6	-15.5 ± 1.7
Inferoseptal	-19.6 ± 3.7	-8.6 ± 1.3*	-12.5 ± 1.6*

Values are means ± SE. **P* < 0.05 vs. Sham value; †*P* < 0.05 vs. MI-control value.

Basic echographic parameters. It should be noted that physiological heart rates, obtained at the time of echocardiography using a low dose of ketamine, did not differ significantly among the three tested groups (Table 1). When compared with the sham-operated group, 45 min of ischemia in MI-control significantly increased LV diameters and altered systolic function, as assessed by EF and SF. EPO improved EF and LV diastolic diameter, as these two parameters were not significantly different from those observed in the sham-operated group. However, none of the conventional echography parameters in MI-EPO was significantly different from the values observed in MI-control.

Regional and global strains. Because of poor speckle tracking imaging, radial strain was not analyzed in two (1 from sham, and 1 from MI-EPO) of the 24 rats, in which conventional data were measured (feasibility = 91.7%). For the same reason, circumferential strain was not analyzed in four (2 from sham, 1 from MI-control, and 1 from MI-EPO) of the 24 rats (feasibility = 83.3%).

As compared with sham-operated rats, 45 min of ischemia in MI-control significantly decreased most of regional circumferential strain values, all regional radial strain values, and both GS_r and GS_{cir} (Tables 1 and 2). Contrary to all conventional parameters, GS_r was significantly higher in the MI-EPO compared with the MI-control group.

Echographic assessment of infarct size and transmural extension of the necrosis. EF, SF, GS_r , and GS_{cir} were all significantly correlated to the myocardial infarct size, whereas AW thickening was not (Fig. 2). Only GS_r and GS_{cir} were correlated to the transmural extension of the infarct, whereas all conventional parameters were not (Fig. 3). With the use of ROC analysis, GS_{cir} and GS_r were the best parameters for identifying a TEMI > 0.75 (area under the curve, 90.1 and 87.9, respectively) (Fig. 4). A GS_{cir} cutoff value of -9.25% identified TEMI > 0.75 with a sensitivity of 86% and specificity of 85%. A GS_r cutoff value of 26.25% identified TEMI > 0.75 with a sensitivity of 100% and specificity of 77%.

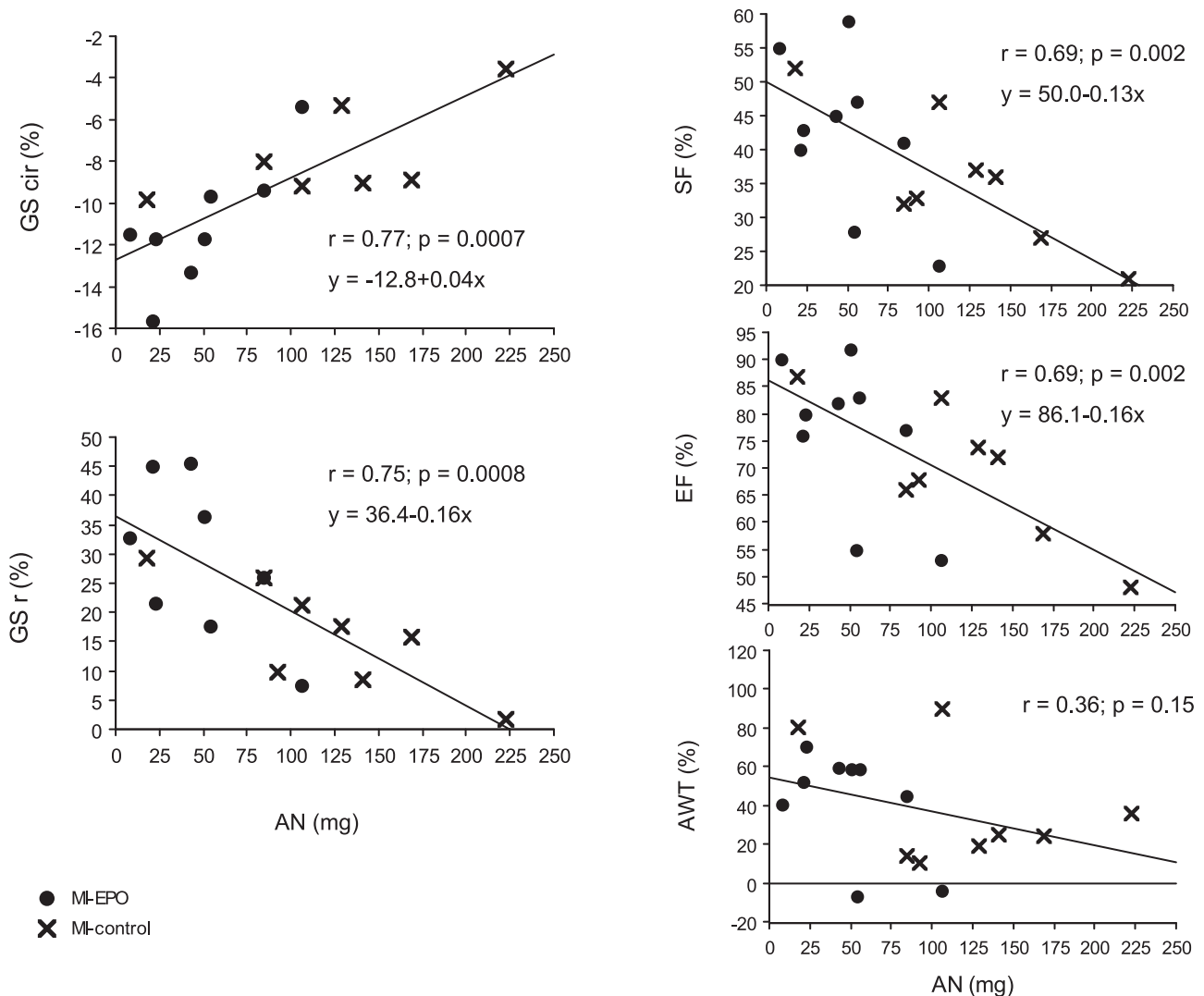


Fig. 2. Scatterplots and correlations of global strains and conventional echocardiography parameters obtained 24 h after surgery vs. infarct size. GS_{cir} , global circumferential strain; GS_r , global radial strain; SF, left ventricular shortening fraction; EF, left ventricular ejection fraction; AWT, anterior wall thickening; AN, area of necrosis.

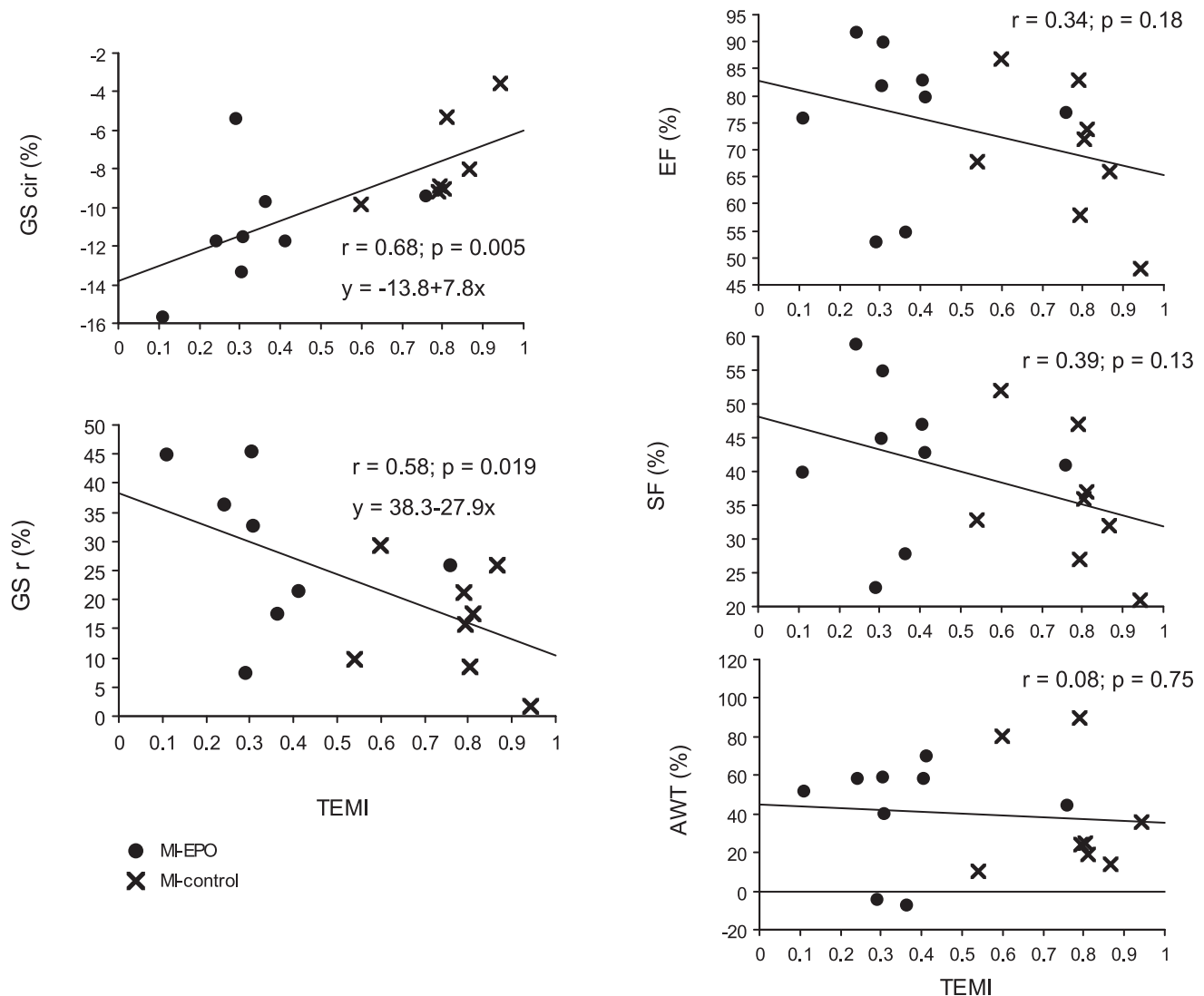


Fig. 3. Scatterplots and correlations of global strains and conventional echocardiography parameters obtained 24 h after surgery vs. transmural extension of MI (TEMI).

Seven Days After Surgery

EPO injected at the time of reperfusion was associated with significant myocardial infarct size reduction 7 days after surgery (Table 3). On the opposite end of the data obtained 24 h after reperfusion, conventional echocardiographic parameters were significantly improved 7 days after EPO treatment. Similarly with the assessment at 24 h, GS_r was significantly higher in the MI-EPO group compared with the MI-control group (Table 3).

EF ($R = 0.68$, $P = 0.012$), SF ($R = 0.72$, $P = 0.008$), and GS_r ($R = 0.82$, $P < 0.001$) were all significantly correlated to AN/AAR while a trend was observed with AW thickening ($R = 0.57$, $P = 0.05$). Contrary to the data observed at 24 h, GS_{cir} was not correlated to AN/AAR ($R = 0.50$, $P = 0.10$).

AW thickening ($R = 0.69$, $P = 0.01$), EF ($R = 0.74$, $P = 0.006$), SF ($R = 0.80$, $P = 0.002$), and GS_r were all correlated to the transmural extension of the infarct at day 7, whereas GS_{cir} was not ($R = 0.31$, $P = 0.33$).

DISCUSSION

In this rat model of ischemia-reperfusion, GS_r and GS_{cir} assessed by speckle tracking imaging were more accurate than conventional echocardiography parameters for quantifying the transmural extension of the necrosis early after reperfusion. As early as 24 h after reperfusion, GS_r noticeably demonstrated its ability to predict the decrease in infarct size and transmural extension when using EPO at the time of reperfusion. To our knowledge, this is the first study to report the usefulness of speckle tracking imaging in the early evaluation of a cardioprotective treatment in rodents.

Echocardiography is essential for research focused on cardioprotection approaches in rodent models of ischemia-reperfusion. Conventional echocardiography parameters are widely used in these models to noninvasively assess the postinfarct remodeling process, allowing for a longitudinal follow-up of LV dilatation and systolic dysfunction (4). Combined Doppler transmitral flow velocity and mitral annulus velocity obtained

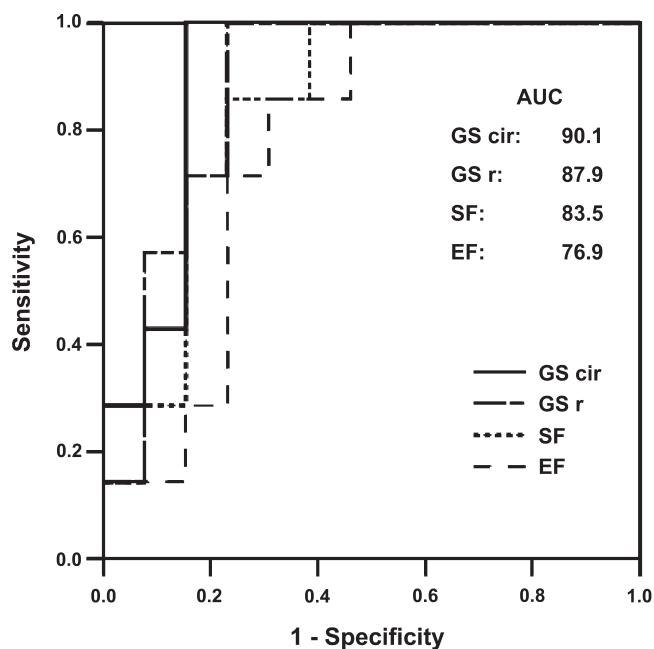


Fig. 4. Receiver operating characteristic curves for identification of TEMI > 0.75 24 h after surgery. AUC, area under curve.

by tissue-Doppler imaging also provides an accurate assessment of LV filling pressures (17). Recently, echocardiographic deformation imaging has been proposed as a novel approach for determining scar size and viability, two major predictors of LV remodeling and outcomes following MI onset. In the clinical setting, strain rate derived from tissue-Doppler imaging appears to be an attractive tool for determining the transmural extension of the necrosis (34). In a murine model of ischemia-reperfusion, strain rate imaging was reported to better predict the transmural extension of the necrosis 24 h, 3 days, and 4 mo after the surgical induction of ischemia-reperfusion than conventional echocardiography parameters (30, 31).

Although Doppler tissue imaging exhibits superior temporal resolution than speckle tracking, the Doppler angle dependency restricts Doppler-derived strain and strain rate assessment to the AW and PW. Two-dimensional strain imaging derived from speckle tracking imaging is based on motion analyses of natural acoustic markers in two-dimensional ultrasonic images. This method has the advantage of tracking acoustic markers in two dimensions along the direction of the wall, rather than along the ultrasound beam (7). This angle independence allows for the assessment of strain in segments that are not perpendicular to the ultrasound beam. Similarly to the strain rate obtained from Doppler tissue imaging, the ability of the two-dimensional strain to differentiate between infarcted and noninfarcted myocardium was validated in a closed-chest swine model of MI (28). Recently, the ability of two-dimensional strain to predict infarct size in humans was compared with Doppler-derived strain performance in the acute phase of ST-segment MI (26). Global longitudinal strain derived from a 16-segment model showed a good correlation with infarct size assessed by magnetic resonance imaging, with the best correlation being seen for global peak systolic speckle strain. Interestingly, circumferential strain assessed from the parasternal short-axis view divided into six segments was the best parameter to separate transmural from subendocardial necrosis (26).

In rats, segmental two-dimensional strain was measured 60 min following a sequence of 12 or 30 min of LAD occlusion (12). Segmental radial and circumferential strains were significantly correlated to segmental infarct size, and the segmental radial strain had the best ability to detect segments with infarction >50%. There was no evaluation of the transmural extension of the necrosis in this work, and global strain values were not reported. In the present study, we chose not to focus on infarct size within each segment but rather on the entire infarct size, which is the most frequently used parameter in research focused on myocardial salvage in the ischemia setting. Using this approach, we demonstrated that GS_r and GS_{cir} assessed 24 h after reperfusion were strongly correlated to the entire infarct size. In terms of viability, global strains also predicted a transmural extension of necrosis >75% in the infarcted segments. The impact of infarct size and transmural extension of necrosis to the global values of strains is consistent with a previously published article, even if global strain values were not reported. Migrino et al. (12) reported a reduction in radial strain, and to a lesser extent circumferential strain, in segments not supplied by the occluded artery, i.e., inferolateral, inferior, and inferoseptal segments (12).

Limits

Global strain values were obtained from a loop of two-dimensional images recorded in a parasternal short-axis view at the papillary muscle level. When calculating the degree of transmural infarct extension by TTC staining, special care was taken to select the slices from the papillary muscle level. Nevertheless, we cannot be absolutely certain that the myocardial regions assessed by TTC were exactly the same as those analyzed using speckle tracking. Although we focused on radial and circumferential strains only, speckle tracking-based global longitudinal strain was reported to be strongly related to infarct size and transmural extension in humans (22, 7). High-quality images from apical long-axis, two- and four-chamber views cannot be obtained from rats. However, the present study was not conducted to develop a new tool in the infarct assessment in humans but to improve myocardial infarct size and viability assessment in a frequently used rat model of ischemia-reperfusion.

While the optimal frame rate for speckle tracking appears to be 50–70 frames per second in humans (7), global strain

Table 3. Infarct size and echocardiographic data 7 days after surgery

	MI-Control	MI-EPO	P Value
n	8	9	
ARR/LV, %	31.0 ± 2.2	32.5 ± 4.2	0.75
AN/AAR, %	36.2 ± 6.0	16.7 ± 3.4	0.02
TEMI, %	45.7 ± 4.8	23.8 ± 4.8	<0.01
LVEDD, mm	7.8 ± 0.4	6.3 ± 0.4	0.02
LVESD, mm	5.7 ± 0.4	3.6 ± 0.4	<0.01
AW thickening, %	38.8 ± 8.6	76.2 ± 7.5	<0.01
PW thickening, %	50.9 ± 5.8	56.8 ± 4.8	0.45
LVEF, %	59.0 ± 3.4	78.5 ± 2.4	<0.01
LVSF, %	27.5 ± 2.0	43.4 ± 2.8	<0.01
GS_r , %	15.5 ± 2.0	27.3 ± 3.0	<0.01
GS_{cir} , %	-10.6 ± 1.7	-16.3 ± 2.4	0.08

Values are means ± SE; n, number of rats. AAR, area at risk; AN, area of necrosis; TEMI, transmural extension of the MI.

measurements in this study were taken from images obtained with high-acquisition frame rates. However, Migrino et al. (12) have compared speckle tracking-based radial and circumferential strains taken at three different frame rates (230–258, 136–189 and 95–105 frames per second), reporting good correlations between data taken from high-frame and those obtained from lower-frame rates.

Our conclusions may be limited to the experimental model we used here. Even if GS_r was highly correlated to variable MI sizes and TEMI 24 h and 7 days after reperfusion in the present study, the definitive answer about the role of speckle tracking in the assessment of myocardial damage at several time points and variable levels of TEMI and AN will require other experiments.

Conclusion

In our experimental conditions, speckle tracking-based strains were valuable noninvasive parameters for assessing early after reperfusion the efficacy of a therapeutic strategy aimed at decreasing infarct size.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Legras and Jerome Roux from the Service Commun de l'Animalerie Hospitalo-Universitaire d'Angers for taking care of the animals.

GRANTS

F. Treguer was supported by a fellowship from the Fédération Française de Cardiologie. N. Ghaboura and S. Tamareille were supported by a fellowship from the Conseil Général du Maine et Loire. This work was funded by the Conseil Général du Maine et Loire and Angers Loire Métropole.

DISCLOSURES

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

REFERENCES

- Amundsen BH, Helle-Valle T, Edvardsen T, Torp H, Crosby J, Lyseggen E, Stoylen A, Ihlen H, Lima JA, Smiseth OA, Stordahl SA. Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 47: 789–793, 2006.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108: 79–85, 2003.
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4802–4806, 2003.
- Chen Y, Escoubet B, Prunier F, Amour J, Simonides WS, Vivien B, Lenoir C, Heimburger M, Choqueux C, Gellen B, Riou B, Michel JB, Franz WM, Mercadier JJ. Constitutive cardiac overexpression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase delays myocardial failure after myocardial infarction in rats at a cost of increased acute arrhythmias. *Circulation* 109: 1898–1903, 2004.
- Cho GY, Chan J, Leano R, Strudwick M, Marwick TH. Comparison of two-dimensional speckle and tissue velocity based strain and validation with harmonic phase magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol* 97: 1661–1666, 2006.
- Christian TF, Schwartz RS, Gibbons RJ. Determinants of infarct size in reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 86: 81–90, 1992.
- Dandel M, Hetzer R. Echocardiographic strain and strain rate imaging—clinical applications. *Int J Cardiol* 132: 11–24, 2009.
- Derumeaux G, Loufoua J, Pontier G, Cribier A, Ovize M. Tissue Doppler imaging differentiates transmural from nontransmural acute myocardial infarction after reperfusion therapy. *Circulation* 103: 589–596, 2001.
- Helle-Valle T, Crosby J, Edvardsen T, Lyseggen E, Amundsen BH, Smith HJ, Rosen BD, Lima JA, Torp H, Ihlen H, Smiseth OA. New noninvasive method for assessment of left ventricular rotation: speckle tracking echocardiography. *Circulation* 112: 3149–3156, 2005.
- Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 68: 18–115, 1983.
- Liu Z, Kastis GA, Stevenson GD, Barrett HH, Furenlid LR, Kupinski MA, Patton DD, Wilson DW. Quantitative analysis of acute myocardial infarct in rat hearts with ischemia-reperfusion using a high-resolution stationary SPECT system. *J Nucl Med* 43: 933–939, 2002.
- Migrino RQ, Zhu X, Pajewski N, Brahmhatt T, Hoffmann R, Zhao M. Assessment of segmental myocardial viability using regional 2-dimensional strain echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 20: 342–351, 2007.
- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11612–11617, 2003.
- Notomi Y, Lysyansky P, Setser RM, Shiota T, Popovic ZB, Martin-Miklovic MG, Weaver JA, Oryszak SJ, Greenberg NL, White RD, Thomas JD. Measurement of ventricular torsion by two-dimensional ultrasound speckle tracking imaging. *J Am Coll Cardiol* 45: 2034–2041, 2005.
- Popovic ZB, Benejam C, Bian J, Mal N, Drinko J, Lee K, Forudi F, Reeg R, Greenberg NL, Thomas JD, Penn MS. Speckle-tracking echocardiography correctly identifies segmental left ventricular dysfunction induced by scarring in a rat model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2809–H2816, 2007.
- Prunier F, Brette S, Delepine S, Geslin P, Le Jeune JJ, Furber AP. Three-dimensional MRI assessment of regional wall stress after acute myocardial infarction predicts postdischarge cardiac events. *J Magn Reson Imaging* 27: 516–521, 2008.
- Prunier F, Gaertner R, Louedec L, Michel JB, Mercadier JJ, Escoubet B. Doppler echocardiographic estimation of left ventricular end-diastolic pressure after MI in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H346–H352, 2002.
- Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H522–H529, 2007.
- Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 100: 187–197, 2005.
- Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56: 786–794, 1977.
- Riksen NP, Hausenloy DJ, Yellon DM. Erythropoietin: ready for prime-time cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 29: 258–267, 2008.
- Roes SD, Mollema SA, Lamb HJ, van der Wall EE, de Roos A, Bax JJ. Validation of echocardiographic two-dimensional speckle tracking longitudinal strain imaging for viability assessment in patients with chronic ischemic left ventricular dysfunction and comparison with contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol* 104: 312–317, 2009.
- Saeed M, Watzinger N, Krombach GA, Lund GK, Wendland MF, Chujo M, Higgins CB. Left ventricular remodeling after infarction: sequential MR imaging with oral nicorandil therapy in rat model. *Radiology* 224: 830–837, 2002.
- Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Ullrich R, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Newell J, Zaroff J, Zapol WM, Picard MH. Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H986–H992, 1999.
- Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 2: 358–367, 1989.
- Sjoli B, Orn S, Grenne B, Ihlen H, Edvardsen T, Brunvand H. Diagnostic capability and reproducibility of strain by Doppler and by speckle tracking in patients with acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging* 2: 24–33, 2009.

27. Stegger L, Hoffmeier AN, Schafers KP, Hermann S, Schober O, Schafers MA, Theilmeyer G. Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET. *J Nucl Med* 47: 1837–1844, 2006.
28. Sun JP, Niu J, Chou D, Chuang HH, Wang K, Drinko J, Borowski A, Stewart WJ, Thomas JD. Alterations of regional myocardial function in a swine model of myocardial infarction assessed by echocardiographic 2-dimensional strain imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 20: 498–504, 2007.
29. Tamarelle S, Ghaboura N, Treguer F, Khachman D, Croue A, Henrion D, Furber A, Prunier F. Myocardial reperfusion injury management: erythropoietin compared with postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2035–H2043, 2009.
30. Thibault H, Gomez L, Donal E, Augeul L, Scherrer-Crosbie M, Ovize M, Derumeaux G. Regional myocardial function after myocardial infarction in mice: a follow-up study by strain rate imaging. *J Am Soc Echocardiogr* 22: 198–205, 2009.
31. Thibault H, Gomez L, Donal E, Pontier G, Scherrer-Crosbie M, Ovize M, Derumeaux G. Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmural by strain rate imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H496–H502, 2007.
32. Thomas D, Bal H, Arkles J, Horowitz J, Araujo L, Acton PD, Ferrari VA. Noninvasive assessment of myocardial viability in a small animal model: comparison of MRI, SPECT, and PET. *Magn Reson Med* 59: 252–259, 2008.
33. van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 46: 125–133, 2005.
34. Vartdal T, Brunvand H, Pettersen E, Smith HJ, Lyseggen E, Helle-Valle T, Skulstad H, Ihlen H, Edvardsen T. Early prediction of infarct size by strain Doppler echocardiography after coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 49: 1715–1721, 2007.
35. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 121: 522–530, 1985.
36. Wu MC, Gao DW, Sievers RE, Lee RJ, Hasegawa BH, Dae MW. Pinhole single-photon emission computed tomography for myocardial perfusion imaging of mice. *J Am Coll Cardiol* 42: 576–582, 2003.
37. Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Toufektsian MC, French BA. Simultaneous evaluation of infarct size and cardiac function in intact mice by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging reveals contractile dysfunction in noninfarcted regions early after myocardial infarction. *Circulation* 109: 1161–1167, 2004.



Liste des principales abréviations

IDM	Infarctus du Myocarde
I/R	Ischémie-Reperfusion
PCI	<i>Percutaneous Coronary Intervention</i>
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
Akt	Protéine kinase B
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase1/2</i>
JAK/STAT	<i>Janus Tyrosine Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
GSK-3 β	Glycogène Synthase Kinase-3 beta
mPTP	Pore de Transition de Perméabilité mitochondriale
PKC	Protéine Kinase C
Canaux K ⁺ _{ATP}	Canaux potassium ATP dépendants
VG	Ventricule Gauche
IPost	Postconditionnement Ischémique
EPO	Érythropoïétine
RIPost	Postconditionnement à distance
RIPC	Préconditionnement à distance
TTC	Chlorure du Triphényltetrazolium
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling</i>
STZ	Streptozotocin

Liste des illustrations

	Page
Fig. 1 - La taille finale de l'infarctus est la conséquence des lésions myocardiques survenues pendant l'ischémie et lors de la reperfusion	7
Fig. 2 - Contribution des lésions létales de reperfusion dans la taille finale de l'infarctus du myocarde	11
Fig. 3 - L'unité basique du pore de transition	17
Fig. 4 - Schéma représentatif de différentes voies de signalisation	18
Fig. 5 - La voie RISK et ses différents effecteurs	20
Fig. 6 - Rôle du TNF α dans les lésions de reperfusion	21
Fig. 7 - Les principales composantes de la voie RISK et la voie SAFE	24
Fig. 8 - Le mécanisme d'action du postconditionnement	31
Fig. 9 - Récapitulatif des principales voies de signalisation impliquées dans le mécanisme du IPost	34
Fig. 10 - Protection inter-organe contre les lésions de reperfusion myocardique	36
Fig. 11 - Les potentiels mécanismes d'action responsable de la cardioprotection induite par le conditionnement à distance	39
Fig. 12 - Les voies de signalisation intracellulaires activées par l'EPO	50
Fig. 13 - Schématisation de l'altération des voies de signalisation cardioprotectrices en présence du diabète type 1	55
Fig. 14 - Schématisation des pressions générées par le ventricule gauche	63
Tableau 1 - Les études cliniques démontrant un effet bénéfique du conditionnement à distance	45
Tableau 2 - Composition du tampon de lyse	64

Tableau 3 - Les études cliniques du postcontionnement ischémique et pharmacologique réalisées chez des patients ayant un IDM avec une élévation du ségment ST

88

Cardioprotection à la phase aiguë de l'infarctus

Résumé : La reperfusion coronaire précoce et complète est le moyen le plus efficace pour limiter l'étendue de l'infarctus myocardique. Revers de la médaille, cette reperfusion est à l'origine des lésions nommées lésions de reperfusion. La recherche d'un moyen protecteur qui limite la survenue de ces lésions a un intérêt clinique majeur. Le postconditionnement ischémique (IPost) qui désigne l'application de plusieurs séquences d'ischémie/reperfusion au moment de la reperfusion coronaire peut prévenir la survenue des lésions de reperfusion mais il n'est applicable qu'aux patients reperfusés par angioplastie. Le mécanisme d'action du IPost passe en partie par l'activation de la voie RISK (composée de la voie PI3K/Akt et ERK1/2) et le sous-effecteur en commun la GSK-3 β . 1) Dans la première partie du travail nous avons comparé l'effet cardioprotecteur d'un agent pharmacologique activateur de la voie RISK (l'érythropoïétine ; EPO) à celui du IPost dans un même modèle expérimental. Une meilleure cardioprotection a été observée avec l'EPO, résultante d'une meilleure phosphorylation d'ERK1/2 et de la GSK-3 β . 2) Après avoir apprécié la cardioprotection induite par EPO chez des rats sains, nous avons testé son effet chez des rats ayant un diabète type I ou une insulino-résistance. Une inhibition de l'effet cardioprotecteur de l'EPO a été observée chez les rats diabétiques avec une altération de la voie RISK et par conséquence une absence de la phosphorylation de la GSK-3 β . Par contre, son effet a été maintenu en présence d'une insulino-résistance. Une dose plus élevée d'EPO n'a pas restauré la cardioprotection. Alors que l'effet protecteur de l'EPO est altéré en présence du diabète, les inhibiteurs de la GSK-3 β semble être une alternative efficace, puisque l'injection de SB216763 (un inhibiteur de la GSK-3 β) a induit un effet protecteur dans notre modèle de rat diabétique. 3) Dans la troisième partie du travail nous nous sommes attachés à mieux comprendre le mécanisme cardioprotecteur du postconditionnement à distance (RIPost). Cette application non invasive de brefs séquences d'ischémie/reperfusion au niveau d'un organe à distance du cœur permet d'atténuer les lésions de reperfusion myocardique. L'effet cardioprotecteur du RIPost a été comparable à celui d'un IPost local avec une activation des mêmes voies de signalisation (RISK/GSK-3 β).

Mots clés : Infarctus du myocarde, lésions de reperfusion, postconditionnement ischémique, érythropoïétine, diabète, postconditionnement à distance, la voie RISK, GSK-3 β

Cardioprotection in acute myocardial infarction

Abstract: Prompt reperfusion remains the mainstay strategy for reducing myocardial infarct size and improving outcomes. Paradoxically, reperfusion itself may induce myocardial damage termed, reperfusion injury. Improvements in morbidity and mortality would not be achieved by reperfusion without new adjunctive therapies. Although ischemic postconditioning (IPost, brief intermittent periods of ischemia and reflow applied at the onset of reperfusion following sustained ischemia) has been successful in attenuating infarct size in all species including humans, its use is limited to patients with ongoing acute myocardial infarction subjected to coronary angioplasty. IPost has been shown to exert its cardioprotective effect by upregulating prosurvival kinases named RISK (consisting of PI3K/Akt and ERK1/2) and the downstream target GSK-3 β . 1) First, we thought to compare the cardioprotective effect of IPost and a pharmacological cardioprotective agent (erythropoietin, EPO), known to activate the same signalling pathways. In our model, EPO showed a trend for better protective effects than IPost through higher phosphorylation levels of ERK1/2 and GSK-3 β . 2) Second, we examined whether EPO-induced cardioprotection is maintained in presence of type I diabetes and insulin resistance syndrome. Diabetic rat hearts were refractory to EPO-induced cardioprotection with altered components of RISK signalling pathway that inhibit GSK-3 β . Moreover, this lack of cardioprotection was not dose-related, since higher EPO doses did not restore the cardioprotective effects. Interestingly, direct inhibition of GSK-3 β may provide an alternative therapeutic option to reduce infarct size in presence of diabetes. On the other hand, the cardioprotective effect of EPO was maintained in our model of insulin resistance syndrome. 3) In the third part of this work we thought to examine the mechanism involved in remote postconditioning (RIPost)-induced cardioprotection. RIPost, a non-invasive application of brief ischemia in remote organs just before myocardial reperfusion, is a novel approach to attenuate reperfusion injury. In our model, RIPost was as effective as local IPost to prevent reperfusion injury with trend superiority to RIPost. Similarly to IPost, RIPost activated RISK pathway. GSK-3 β would be implicated in RIPost-induced cardioprotection.

Keywords: Myocardial infarction, reperfusion injury, ischemic postconditioning, erythropoietin, diabetes, remote postconditioning, RISK pathway, GSK-3 β