



HAL
open science

**Caractère biphasique de l'hypoxie intermittente :
mécanismes cardioprotecteurs induits par une exposition
aiguë et conséquences inflammatoires d'une exposition
chronique.**

Pauline Béguin

► **To cite this version:**

Pauline Béguin. Caractère biphasique de l'hypoxie intermittente : mécanismes cardioprotecteurs induits par une exposition aiguë et conséquences inflammatoires d'une exposition chronique.. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. Français. NNT : . tel-00149355

HAL Id: tel-00149355

<https://theses.hal.science/tel-00149355v1>

Submitted on 25 May 2007

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.

THÈSE

présentée
devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1
pour l'obtention
du DIPLÔME DE DOCTORAT
(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le 8 décembre 2006 par

Pauline BÉGUIN

CARACTÈRE BIPHASIQUE DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE :

MÉCANISMES CARDIOPROTECTEURS INDUITS PAR UNE EXPOSITION AIGUË

ET

CONSÉQUENCES INFLAMMATOIRES D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE.

JURY :

M. le Professeur Michel OVIZE
M. le Professeur Luc ROCHETTE
M. le Professeur Roger MARTHAN
M. le Professeur Jean-Marc PEQUIGNOT
M. le Professeur Patrick LEVY
M. le Professeur Christophe RIBUOT

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur R. GARRONE

M. le Professeur G. ANNAT

M. G. GAY

SECTEUR SANTÉ

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-
DURAND

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

UFR de Médecine Lyon-Nord

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

UFR de Médecine Lyon-Sud

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

UFR d'Odontologie

Directeur : M. O. ROBIN

Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de
Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

UFR de Biologie

Directeur : M. le Professeur H. PINON

UFR de Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

UFR de Génie Electrique et des Procédés

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

UFR Sciences de la Terre

Directeur : M. le Professeur P.

HANTZPERGUE

UFR de Mathématiques

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

UFR d'Informatique

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

UFR de Chimie Biochimie

Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF

UFR STAPS

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Observatoire de Lyon

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Institut des Sciences et des Techniques de
l'Ingénieur de Lyon

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

IUT A

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

IUT B

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement le Professeur **Christophe Ribuot**, qui m'a accueillie, il y a quatre ans, dans son équipe « cardioprotection ». Je le remercie de la confiance qu'il m'a témoignée durant ces années, merci pour son aide aussi bien professionnelle que personnelle.

Je remercie le Professeur **Michel Ovize**, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

Je remercie les Professeurs **Luc Rochette** et **Roger Marthan** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que le Professeur **Jean-Marc Péquignot** d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je remercie le Professeur **Patrick Lévy** de m'avoir accueillie dans son laboratoire.
Merci de l'attention qu'il a manifestée pour ce travail. Merci également d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Elise, je te remercie tout d'abord d'avoir fait le bon choix il y a deux ans !

Ces deux années passées avec toi ont été riches en émotions ! Merci d'avoir été une amie à chaque moment, merci pour ton réconfort et ton soutien inconditionnels.

Julia, ma coéquipière de rédaction, merci d'avoir passé du temps, à lire et relire ce manuscrit. Sans doute l'été le plus inoubliable de notre vie !

Amandine et Blandine, merci pour l'aide que vous m'avez apportée en informatique et en sommaire automatique, mais aussi pour le reste !

Claire, merci pour ton amitié, et aussi de m'avoir permis de découvrir la Suisse (son chocolat !), j'ai hâte de poursuivre l'expérience genevoise ici, avec toi !

Diane, je te remercie pour ton accent québécois qui ne m'a pas fait oublier ce pays qui m'a tant plu, merci également pour ton entrain, ton dynamisme, le temps passé à discuter science, enseignement et autres choses de la vie.

Marie, Sandrine et Dominique, merci pour votre aide.

Un grand merci à mes amis d'ici ou d'ailleurs.

Un petit clin d'œil à toi, Morgan !

A mes parents et mon frère qui m'ont plus qu'encouragée pendant mes quatre années grenobloises.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	10
1^{ère} PARTIE : ÉTUDE DES MÉCANISMES CARDIOPROTECTEURS INDUITS PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE AIGÜE.....	14
1 Introduction.....	15
1.1 Ischémie-reperfusion myocardique	16
1.1.1 Généralités	16
1.1.2 L'ischémie myocardique	16
1.1.3 La reperfusion du myocarde ischémique.....	18
1.2 Le préconditionnement.....	24
1.2.1 Généralités	24
1.2.2 Préconditionnement hypoxique	27
1.2.3 Voies de signalisation mises en jeu dans le PC retardé en général	27
1.2.3.1 Les déclencheurs ou «triggers»	28
1.2.3.2 Voies de signalisation intracellulaire : les protéines kinases.....	31
1.2.3.3 Les médiateurs	33
2 Objectif de ce travail.....	36
3 Matériel et Méthodes	38
3.1 Matériel biologique	39
3.2 Stress hypoxique.....	39
3.3 Ischémie myocardique	41
3.3.1 Modèle de Langendorff.....	41
3.3.2 Traitements pharmacologiques.....	42
3.3.3 Détermination de la taille de l'infarctus	43
3.4 Western immunoblot.....	43
3.4.1 Préparation des échantillons	43
3.4.2 Dosage des protéines	44
3.4.3 Western immunoblot	44
3.5 Analyse statistique.....	45

4	Résultats	46
4.1	Mise en place du protocole de PC hypoxique	47
4.1.1	Etude 1 : L'hypoxie intermittente aiguë améliore la tolérance à l'ischémie chez le rat.....	47
4.1.2	Résultats additionnels.....	55
4.2	Voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection induite par l'HI aiguë.....	57
4.2.1	Etude 2 : La cardioprotection retardée induite par l'hypoxie intermittente est médiée par la PKC et déclenchée par la p38 MAP kinase et Erk1/2.....	57
4.2.2	Résultats additionnels.....	88
5	Discussion et perspectives.....	92
5.1	L'hypoxie intermittente aiguë, un modèle de préconditionnement.....	93
5.2	Les déclencheurs du PC hypoxique	95
5.3	Les médiateurs du PC hypoxique	97
5.4	Conclusion et perspectives.....	100

2^{ème} PARTIE : RÉPONSE INFLAMMATOIRE INDUITE PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE CHRONIQUE..... 102

6	Introduction.....	103
6.1	Conséquences cardiovasculaires du SAOS.....	104
6.1.1	Hypertension artérielle	105
6.1.2	Coronaropathie	106
6.2	Mécanismes potentiels reliant le SAOS aux maladies cardiovasculaires	107
6.2.1	Inflammation	107
6.2.1.1	Le processus d'athérosclérose	108
6.2.1.2	Les chimiokines	108
6.2.2	Stress oxydant.....	111
6.3	Modèles expérimentaux animaux.....	113
7	Objectif de ce travail.....	114

8	Matériel et méthodes.....	116
8.1	Matériel biologique	117
8.2	Hypoxie chronique	117
8.3	Dosage sanguin.....	117
8.4	Microscopie intravitale	118
8.5	Test de prolifération.....	118
8.6	Technique de RT-PCR en temps réel	119
8.7	Analyse statistique.....	121
9	Résultats	122
9.1	Développement d'un processus inflammatoire suite à une hypoxie intermittente chronique.....	123
9.1.1	Etude 3 : L'hypoxie intermittente dans le syndrome d'apnées du sommeil induit une réponse inflammatoire chez la souris	123
10	Discussion et Perspectives	144
10.1	Inflammation et HI	145
10.2	Conclusion et perspectives.....	147
	BIBLIOGRAPHIE	149

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

- Figure 1.** Mécanismes possibles de la dysfonction myocardique post-ischémique.
- Figure 2.** Mécanismes du développement de l'infarctus.
- Figure 3.** Représentation schématique des différents mécanismes cellulaires conduisant au PC retardé.
- Figure 4.** Réaction de synthèse du NO \cdot .
- Figure 5.** Variation de la teneur en O $_2$ à l'intérieur des cages (de 21 à 5%) au cours des cycles d'HI.
- Figure 6.** Représentation schématique du dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie.
- Figure 7.** Effets de la perfusion d'aminoguanidine chez des rats exposés à la normoxie ou à l'hypoxie intermittente.
- Figure 8.** Effet de la perfusion de paxilline sur la taille de l'infarctus chez des rats exposés à la normoxie ou à l'hypoxie intermittente.
- Figure 9.** Infiltration des LDLs (1), rôle des macrophages (2) et activation des lymphocytes T (3) dans l'inflammation artérielle.
- Figure 10.** Représentation d'amplifications par PCR et principe du Ct.
- Tableau 1.** Concentration des substances pharmacologiques perfusées avant l'ischémie.
- Tableau 2.** Concentration des substances pharmacologiques injectées avant le stress HI.
- Tableau 3.** Dilution et tampon de dilution des anticorps primaires utilisés pour les Western blots.

LISTE DES ABREVIATIONS

5-HD : 5 hydroxydécanoate	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
AG : acides gras	NO : monoxyde d'azote
ATP : adénosine tri phosphate	NOS : NO synthase
BH4 : 6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine	p38 MAP kinase : p38 mitogen activated protein kinase
Canaux K_{ATP} : canaux potassiques ATP-dépendant	p42/44 MAP kinase : p42/44 mitogen activated protein kinase
Canaux KCa : canaux potassiques calcium-dépendant	PA : pression artérielle
Chel : chélerythrine	PC : préconditionnement
CRP : C-reactive protein	PCR : polymérase chain reaction
DC : débit coronaire	PDVG : pression développée par le ventricule gauche
EIM : épaisseur intima media	PECAM : platelet endothelial cell adhesion molecule
Erk1/2 : extracellular signal-regulated protein kinases	PI3K : phosphatidylinositol-3-phosphate kinase
FAD : flavine adénine dinucléotide	PKC : protéine kinase C
FC : fréquence cardiaque	PPC : pression positive continue
FiO₂ : fraction inspirée en oxygène	PTDVG : pression télédiastolique du ventricule gauche
FMN : flavine adénine mononucléotide	PVDF : polyvinylidène difluoride
HC : hypoxie continue	RANTES : regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
HDL : high density lipoprotein	RIPA : tampon, RadioImmunoPrecipitation Assay
HI : hypoxie intermittente	RL : radicaux libres
HTA : hypertension artérielle	RLO : radicaux libres de l'oxygène
i.p. : intra péritonéale	RS : réticulum sarcoplasmique
i.v. : intra veineuse	RT-PCR : reverse transcription polymérase chain reaction
IAH : indice d'apnées-hypopnées	SAOS : syndrome d'apnées obstructives du sommeil
ICAM : intercellular adhesion molecule	SarcK_{ATP} : canaux K_{ATP} sarcolemiques
IL-18 : interleukine 18	SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
IL-6 : interleukine 6	TNF-α : tumor necrosis factor- α
iNOS ou NOS-2 : NO synthase inductible	VCAM : vascular cellular adhesion molecule
JNK : c-Jun aminé terminal protéine kinase	
LDL : low density lipoprotein	
L-NAME : nitro-L-arginine methyl ester	
MAP kinase : mitogen activated protein kinase	
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1	
MIP-1α : macrophage inflammatory protein 1 alpha	
MitoK_{ATP} : canaux K_{ATP} mitochondriaux	
MPG : mercaptopropionyl glycine	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans les pays occidentaux. Alors qu'il existe aujourd'hui une réelle avancée dans le traitement de ces maladies, l'infarctus du myocarde reste la première cause de décès au monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé et représente encore plus de 10% des décès en France.

L'infarctus du myocarde se définit comme la nécrose (mort) d'une zone plus ou moins étendue du muscle cardiaque suite à une occlusion coronaire, provoquant l'ischémie de cette zone.

A l'heure actuelle, le seul moyen de limiter le développement de cette nécrose cellulaire, est de reperfusion le plus rapidement le territoire ischémié, à l'aide d'agents pharmacologiques ou de techniques chirurgicales. Cette restauration de la circulation coronaire, après un épisode ischémique, n'est cependant pas sans risque et peut entraîner des lésions réversibles ou non [1, 2]. Les lésions les plus fréquemment observées suite à une séquence d'ischémie-reperfusion sont des arythmies ventriculaires, une nécrose des cardiomyocytes et des altérations des paramètres hémodynamiques, de la fonction endothéliale ou du métabolisme énergétique.

Le cœur possède cependant une capacité remarquable d'adaptation au stress, en induisant des mécanismes endogènes de défense qui conduisent à améliorer la récupération du myocarde à la reperfusion. Cette faculté d'adaptation peut d'ailleurs être utilisée dans un but protecteur. Ce phénomène, appelé préconditionnement (PC), consiste à soumettre le cœur à un stress non léthal (ischémie courte, hyperthermie..) capable de le protéger contre un stress prolongé ultérieur.

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) se caractérise par des arrêts de la respiration, fréquents (plus de dix par heure) et de longue durée (plus de dix secondes), provoqués par une obstruction pharyngée plus ou moins complète, entraînant une diminution de la profondeur du sommeil et une hypoxie (diminution de la saturation en oxygène). Cette obstruction pharyngée peut être à l'origine d'apnée (obstruction complète) ou d'hypopnée (obstruction partielle provoquant une diminution de plus de 50% du flux inspiratoire).

La prévalence du SAOS dans la population d'âge moyen est de 4% chez les hommes et de 2% chez les femmes. Le SAOS est responsable d'une augmentation du risque cardiovasculaire (hypertension artérielle, infarctus du myocarde, troubles du rythme ventriculaires et survenue d'accident vasculaire cérébral).

L'hypoxie est une situation de stress cellulaire dans laquelle les tissus de l'organisme reçoivent une quantité insuffisante d'oxygène. Dans le SAOS, cette hypoxie a la spécificité d'être intermittente, correspondant à l'alternance répétée d'épisodes d'hypoxie et de réoxygénation. Cette hypoxie intermittente (HI), composante majeure du SAOS, est à l'origine d'une hypertension artérielle systémique et d'une augmentation de l'activité sympathique chez le rat [3].

Alors que la plupart des études indiquent que la prévalence augmente fortement avec l'âge, de récentes observations suggèrent que les jeunes patients atteints de SAOS présentent un risque de mortalité important, qui semble décliner avec l'âge (> 50 ans) [4]. Il a été émise l'hypothèse qu'une protection au niveau cardiaque et cérébral pourrait expliquer cette diminution de la mortalité avec l'âge, chez les patients SAOS [5]. Cette protection s'expliquerait par le développement d'un PC ischémique provoqué par les cycles répétés d'hypoxie-réoxygénation. Il semble ainsi que l'HI peut avoir des effets bénéfiques et qu'elle n'est pas seulement responsable d'effets délétères observés dans le SAOS.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude des effets, au niveau cardiovasculaire, d'une hypoxie intermittente aiguë. Cette partie débute par une introduction sur l'ischémie-reperfusion et le phénomène de preconditionnement. Elle se poursuit par la mise en évidence d'un preconditionnement retardé induit par l'HI. Ce travail est présenté dans deux articles.

La deuxième partie est consacrée à l'étude des conséquences délétères d'une exposition chronique à l'HI, comme celle rencontrée dans la pathologie du SAOS. En particulier, nous nous sommes intéressés au processus inflammatoire développé suite à une HI chronique chez la souris. Cette partie débute par une introduction sur les conséquences cardiovasculaires

associées au SAOS et sur les modèles animaux utilisés pour étudier les conséquences de l'HI chronique. Elle se poursuit par la présentation des résultats obtenus qui a fait l'objet d'un troisième article.

**1^{ère} PARTIE : ÉTUDE DES MÉCANISMES
CARDIOPROTECTEURS INDUITS PAR L'HYPOXIE
INTERMITTENTE AIGUË**

1 Introduction

1.1 Ischémie-reperfusion myocardique

1.1.1 Généralités

L'ischémie myocardique se définit comme un déséquilibre entre les besoins, et les apports en oxygène et nutriments du myocarde. L'ischémie apparaît quand le débit sanguin coronaire est diminué par une obstruction partielle ou totale des vaisseaux et que ce débit devient inadéquat pour répondre aux besoins du myocarde. Ce déséquilibre survient lorsqu'il y a une augmentation de la demande en oxygène du myocarde, comme au cours de l'hypertrophie du ventricule gauche, d'une tachycardie ou simplement d'un exercice musculaire. On observe soit une augmentation de la demande associée à une réduction des apports en oxygène du myocarde comme dans le cas de l'angor d'effort, soit une réduction isolée des apports comme dans l'infarctus. La réduction de la circulation sanguine peut être due à un rétrécissement des artères coronaires, à l'obstruction par un thrombus ou à la présence d'une plaque d'athérome. Cette ischémie myocardique peut intéresser une région isolée du cœur (infarctus) ou l'ensemble du muscle cardiaque (chirurgie cardiaque, choc hypovolémique).

1.1.2 L'ischémie myocardique

Le muscle cardiaque a un besoin énergétique de base important pour assurer sa fonction contractile et subvenir aux besoins de ses systèmes cellulaires énergie dépendants. Une occlusion prolongée peut entraîner l'apparition de lésions, tout d'abord réversibles, mais qui deviennent rapidement irréversibles si l'ischémie est maintenue, ce qui peut aboutir, alors, à des modifications hémodynamiques et/ou à des troubles du rythme, mais également évoluer vers la nécrose de la zone concernée.

Dans les conditions physiologiques, l'énergie provient principalement de l'oxydation des acides gras (AG), apportés au myocarde par la circulation. La diminution de l'apport en oxygène provoquée par l'ischémie conduit dans un premier temps à un ralentissement ou à un arrêt total du métabolisme oxydatif et à une stimulation de la glycolyse anaérobie. Celle-ci

permet de compenser en partie le déficit énergétique, mais la production d'ATP reste insuffisante pour couvrir l'ensemble des besoins énergétiques du myocarde. Le pyruvate, produit lors de la glycolyse, ne peut rentrer dans le cycle de Krebs et s'accumule, ce qui favorise sa transformation en lactate. La conséquence principale de ces lésions précoces est la diminution de l'activité contractile.

Si l'ischémie se prolonge, la glycolyse anaérobie est diminuée puis arrêtée complètement, ce qui conduit à un arrêt de la production d'ATP. On observe une accumulation d'équivalents réduits, de lactate et de protons dans les myocytes à l'origine d'une acidose intracellulaire provoquant une inhibition des enzymes de la glycolyse et une augmentation du déficit énergétique. De plus, quel que soit le degré de l'ischémie, le métabolisme oxydatif des AG est interrompu, ce qui conduit à une accumulation de métabolites intermédiaires qui ont des effets délétères sur les membranes cellulaires.

Modifications ioniques et électrophysiologiques

Au cours de l'ischémie, la diminution de la production d'ATP inhibe la pompe sodium/potassium (Na^+/K^+ -ATPase), ce qui conduit à une augmentation intracellulaire de sodium et à une accumulation de potassium à l'extérieur des cellules. D'autre part, l'acidose active l'échangeur sodium-proton (Na^+/H^+) qui permet l'élimination des protons, favorisant ainsi l'accumulation intracellulaire de sodium. Cette surcharge sodique est associée à une entrée d'eau responsable de l'oedème intracellulaire. Le gradient anormal de sodium conduit à l'inversion de l'échangeur sodium-calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$), ce qui provoque une entrée de calcium dans les cellules. L'augmentation des taux de calcium intracellulaire entraîne des lésions au niveau des protéines contractiles, favorisant ainsi la contracture ischémique. L'ischémie entraîne donc de nombreuses modifications des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique. La diminution de la concentration d'ATP provoque également l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants (fermés quand les concentrations d'ATP intra-cellulaires sont élevées), ce qui entraîne une accumulation de potassium à l'extérieur de la cellule. Celle-ci est à l'origine des perturbations électrophysiologiques observées au cours de l'ischémie. On observe notamment une légère dépolarisation des cellules en diastole, une

diminution de l'amplitude et de la durée des potentiels d'action ainsi qu'une élévation du segment ST sur l'électrocardiogramme.

1.1.3 La reperfusion du myocarde ischémiq

A l'heure actuelle, la reperfusion coronaire est reconnue comme étant la seule méthode permettant de réduire la taille de l'infarctus, à condition d'être entreprise suffisamment tôt, ceci est indiscutable aussi bien en clinique que dans les modèles expérimentaux. Cliniquement, la reperfusion précoce est possible grâce au développement de la thrombolyse et de l'angioplastie. Cette reperfusion permet la récupération du myocarde tant qu'il n'y a pas eu de lésions irréversibles. Il n'y a aucun doute qu'une reperfusion précoce est le seul moyen de « sauver » un myocarde ischémiq. Cependant, la reperfusion est une "épée à double tranchant" : la restauration d'un flux sanguin analogue au flux pré-ischémiq provoque des lésions propres à la reperfusion au cours desquelles l'aggravation de la surcharge calcique et la formation de radicaux libres de l'oxygène jouent probablement un rôle important. Ces lésions sont les arythmies de reperfusion, la sidération myocardique (ou «*stunning*»), et la nécrose de reperfusion (accélération de la mort cellulaire).

Lors de la reperfusion, l'apport brutal et massif d'O₂ conduit à la formation de radicaux libres de l'oxygène (RLO), très réactifs. Le terme radical désigne toute espèce chimique instable possédant un électron non apparié ou célibataire. Les espèces radicalaires les plus importantes dans les processus biologiques sont les RLO et l'oxyde nitrique. Il s'agit de l'anion superoxyde (O₂^{·-}), du radical hydroxyle (OH[·]), des radicaux peroxydes (ROO[·]) ainsi que d'autres espèces non-radicalaires mais très réactives dérivées de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène singulet (¹O₂). Les RLO, libérés suite à l'ischémie-reperfusion (Figure 1), provoquent une inactivation des enzymes et une peroxydation des lipides membranaires à l'origine de dommages membranaires touchant le sarcolemme, le réticulum sarcoplasmique (RS) et les mitochondries. On observe au niveau des mitochondries une augmentation de la perméabilité au calcium, ce qui conduit à une augmentation du calcium au niveau du cytosol. L'activation du relargage du calcium par le RS, l'inhibition de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase et la stimulation de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ au niveau du sarcolemme provoquent une augmentation

de calcium intracellulaire favorisant les lésions membranaires et conduisant à un dysfonctionnement contractile.

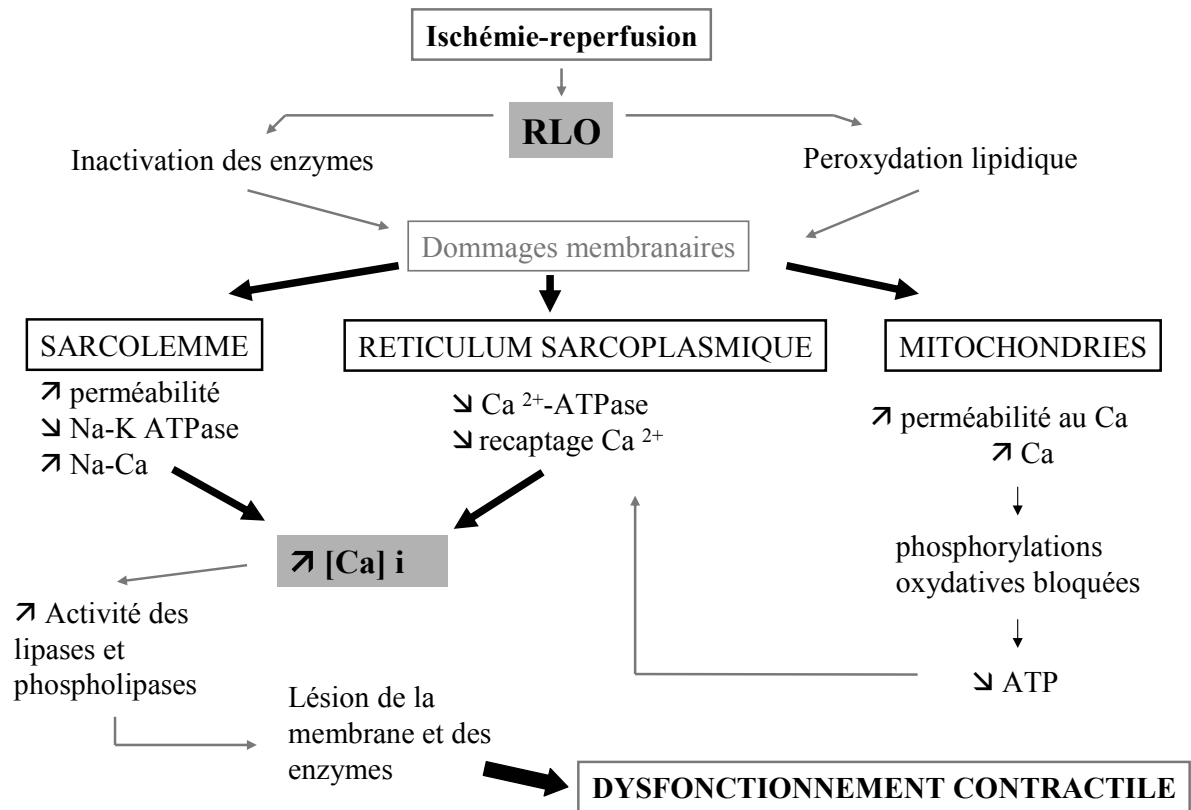


Figure 1 : Mécanismes possibles de la dysfonction myocardique post-ischémique,
d'après Bolli [6].

Les arythmies de la reperfusion

Plus l'ischémie est de courte durée, plus des arythmies de reperfusion sont observées.

Bien que les mécanismes responsables des arythmies de reperfusion restent débattus, il semble que la formation de radicaux libres ainsi que l'excès de calcium soient les principaux acteurs des arythmies de reperfusion.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la reperfusion est à l'origine d'une production de RLO. Il semblerait que la peroxydation des lipides membranaires sous l'effet des RLO conduise à des perturbations de l'équilibre ionique, ce qui aboutirait à des modifications électrophysiologiques responsables des arythmies de reperfusion.

Nous avons également vu que suite à l'ischémie, le déficit énergétique conduit à la surcharge calcique. L'existence d'un excès de calcium libre dans la cellule lors de la reperfusion, ainsi que d'importants mouvements calciques, pourraient donc être à l'origine des arythmies de reperfusion, via la création d'un courant transitoire entrant calcium-dépendant, lui-même à l'origine de post-dépolarisations retardées qui, lorsque leur amplitude est suffisante, peuvent provoquer des extrasystoles ou des tachycardies ventriculaires.

La sidération myocardique ou «stunning»

Malgré l'absence de lésions irréversibles et en présence d'une perfusion sanguine normale, la récupération complète du myocarde ischémique peut nécessiter un délai de quelques heures à plusieurs semaines. La sidération myocardique ou *stunning* correspond à la phase de récupération lente de la fonction myocardique au cours de la reperfusion. Ce phénomène est principalement rencontré suite à une ischémie de courte durée suivie d'une reperfusion. Tout comme pour les arythmies de reperfusion, les deux hypothèses majeures pour expliquer la sidération myocardique sont la surcharge calcique et la formation de RLO.

La surcharge calcique intracellulaire peut entraîner des lésions au niveau des protéines contractiles (activation de protéines kinases ou protéases), provoquant des modifications de la réponse physiologique normale au calcium. La contractilité du myocarde en est ainsi affectée aboutissant à la sidération du myocarde.

Les RLO et la surcharge calcique sont intrinsèquement liés. En effet, nous avons vu précédemment que les RLO participent à la surcharge calcique par le biais des dommages membranaires qu'ils créent au niveau du sarcolemme, du RS et des mitochondries (Figure 1).

L'infarctus du myocarde

Dans l'infarctus aigu du myocarde, un nombre significatif de cellules cardiaques ischémiques meurent. Cette mort cellulaire évolue de l'endocarde vers l'épicarde et du centre de la nécrose vers la périphérie. 50% de la zone ischémique est détruite en 2 heures, 100% en 4 à 6 h. Cette vitesse est variable d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce.

L'ischémie induit une diminution de la distribution d'O₂ et de l'élimination des métabolites (Figure 2). Il s'ensuit une perte critique de la quantité d'ATP qui conduit à (1) une accumulation de calcium, (2) des lésions membranaires provoquées par l'accumulation des métabolites des AG, la rétention de sodium et d'eau conduisant à l'œdème et l'éclatement des cellules, la peroxydation lipidique induite par la formation de RLO lors de la reperfusion, (3) une inhibition de la pompe Na⁺/K⁺-ATPase qui accentue l'accumulation de sodium intracellulaire, à l'origine de l'œdème cellulaire. La surcharge calcique qui est ainsi provoquée, peut activer des phospholipases, à l'origine de la destruction des lipides membranaires, augmenter la contracture et provoquer des arythmies létales.

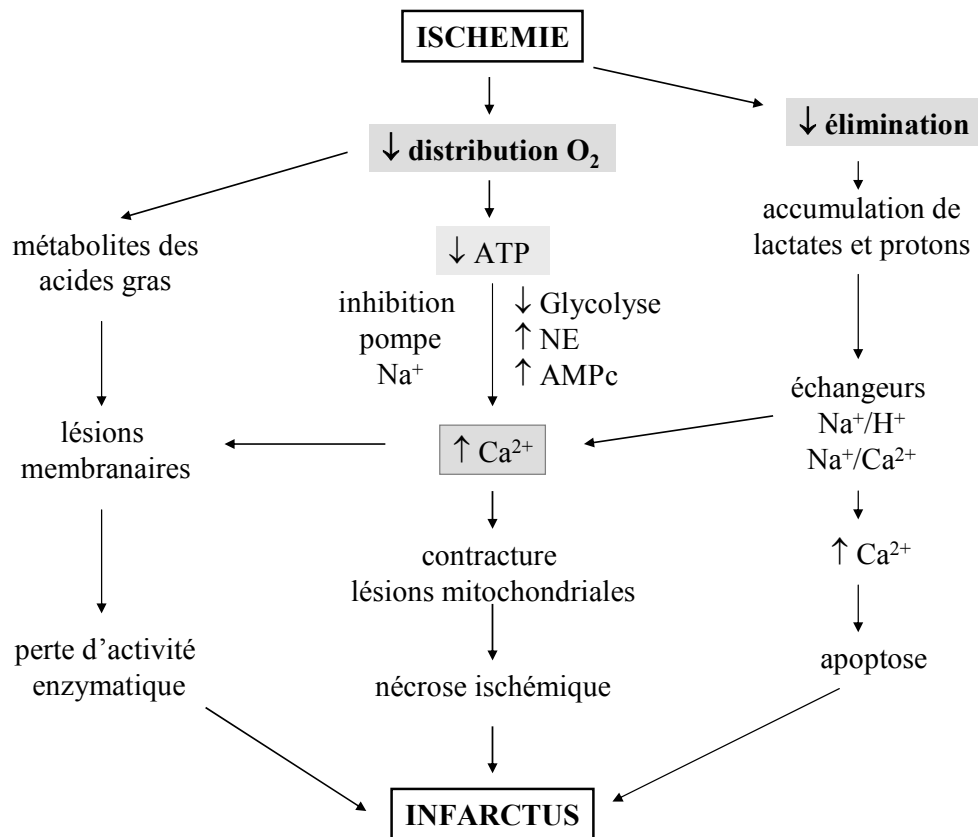


Figure 2 : Mécanismes du développement de l'infarctus d'après Opie [7].

La gravité des lésions d'ischémie-reperfusion dépend de la durée et de la sévérité de l'ischémie, ainsi que la taille de la zone ischémique.

Pendant les premières minutes d'ischémie, les dommages cellulaires restent totalement réversibles : si la perfusion coronaire est rétablie, il n'y aura pas de nécrose. Les cellules retrouvent un métabolisme et une fonction normaux dans les heures ou les jours qui suivent la reperfusion. Si l'ischémie est prolongée (durée supérieure à 30 minutes), les cellules cardiaques sont irréversiblement endommagées et l'intervalle de temps entre l'épisode ischémique et la nécrose cellulaire dépend du réseau de collatérales, vaisseaux qui suppléent l'irrigation du myocarde ischémique. Ce réseau est très variable selon les espèces (très important chez le cobaye et quasiment inexistant chez le rat) et selon l'âge des individus (chez l'homme ce réseau se développe avec l'âge). L'ischémie évolue vers la nécrose en 20 à 60 minutes s'il n'existe pas de collatérales, et ce temps peut aller jusqu'à 2 à 6 heures en présence de collatérales.

La zone à risque, qui correspond à la région du myocarde vascularisée par l'artère coronaire occluse, est un déterminant essentiel du volume final de l'infarctus.

Le myocarde possède des systèmes puissants pour lutter contre, voire prévenir, les conséquences de l'ischémie et de la reperfusion. Le phénomène de préconditionnement est l'illustration de la capacité d'adaptation du myocarde pour limiter l'agression ischémique, à condition que celle-ci ne soit pas trop intense et trop prolongée.

1.2 Le préconditionnement

1.2.1 Généralités

Murry et collaborateurs [8] ont montré que des occlusions coronaires brèves (trop courtes pour provoquer une nécrose myocytaire) réalisées avant une occlusion plus prolongée (de durée suffisante pour provoquer un infarctus myocardique) pouvaient réduire 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 appelé préconditionnement ou PC (traduction de l'anglais "*preconditioning*").

Ce mécanisme, capable d'induire une protection contre les effets délétères d'une ischémie, a été très étudié, et cette cardioprotection a été retrouvée dans toutes les espèces étudiées (rat, souris, lapin, chien, porc) [9] dont l'homme.

Il est reconnu, dans la majorité des espèces, que le PC induit deux phases distinctes de protection : la première, appelée « PC classique », se manifeste pendant 1 à 2 heures après le stimulus préconditionnant initial ; la seconde, en revanche, communément appelée « PC retardé », apparaît environ 24 heures après le stimulus initial et persiste jusqu'à 72 heures [10, 11]. Ce PC retardé semble mettre en jeu d'autres mécanismes que ceux impliqués dans la première fenêtre de protection puisqu'un délai minimum est nécessaire entre le stress préconditionnant et l'ischémie nécosante. Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons essentiellement au PC retardé.

Les effets protecteurs du PC sont multiples, le PC ischémique est capable de limiter la taille de l'infarctus [12], d'améliorer la récupération fonctionnelle post-ischémique, de réduire la sidération myocardique post-ischémique [13, 14], ainsi que les arythmies de reperfusion [15], ou encore de préserver la fonction endothéliale coronaire [16].

Les stimuli initiateurs du PC retardé

La protection retardée contre les lésions d'ischémie-reperfusion peut être induite par divers stimuli [17]. Ils peuvent être classés en stimuli non pharmacologiques et pharmacologiques. Les premiers sont, outre l'ischémie, le stress thermique, la stimulation ventriculaire rapide, l'exercice et l'hypoxie [25]. Parmi les stimuli pharmacologiques, on retrouve, soit des agents naturels souvent nocifs, tels l'endotoxine [18], le tumor necrosis factor- α (TNF- α) [19], les RLO [20], soit des substances utilisables en clinique, tels des agonistes des récepteurs à l'adénosine [21], des donneurs de NO [22], des ouvreurs des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) comme le diazoxide [23] ou encore des agonistes des récepteurs aux opioïdes [24].

Les mécanismes du PC retardé

Le PC retardé est le résultat d'une cascade de signalisation cellulaire complexe (Figure 3). Cette cascade comporte trois étapes principales. Les stimuli (1), stress ou substances pharmacologiques, induisent des molécules qui déclenchent (« déclencheurs », (2)) la réponse adaptatrice et l'activation de voies de signalisation générant des « médiateurs » (3), exprimés 24 à 72 heures après le stimulus, et conduisant à la cardioprotection.

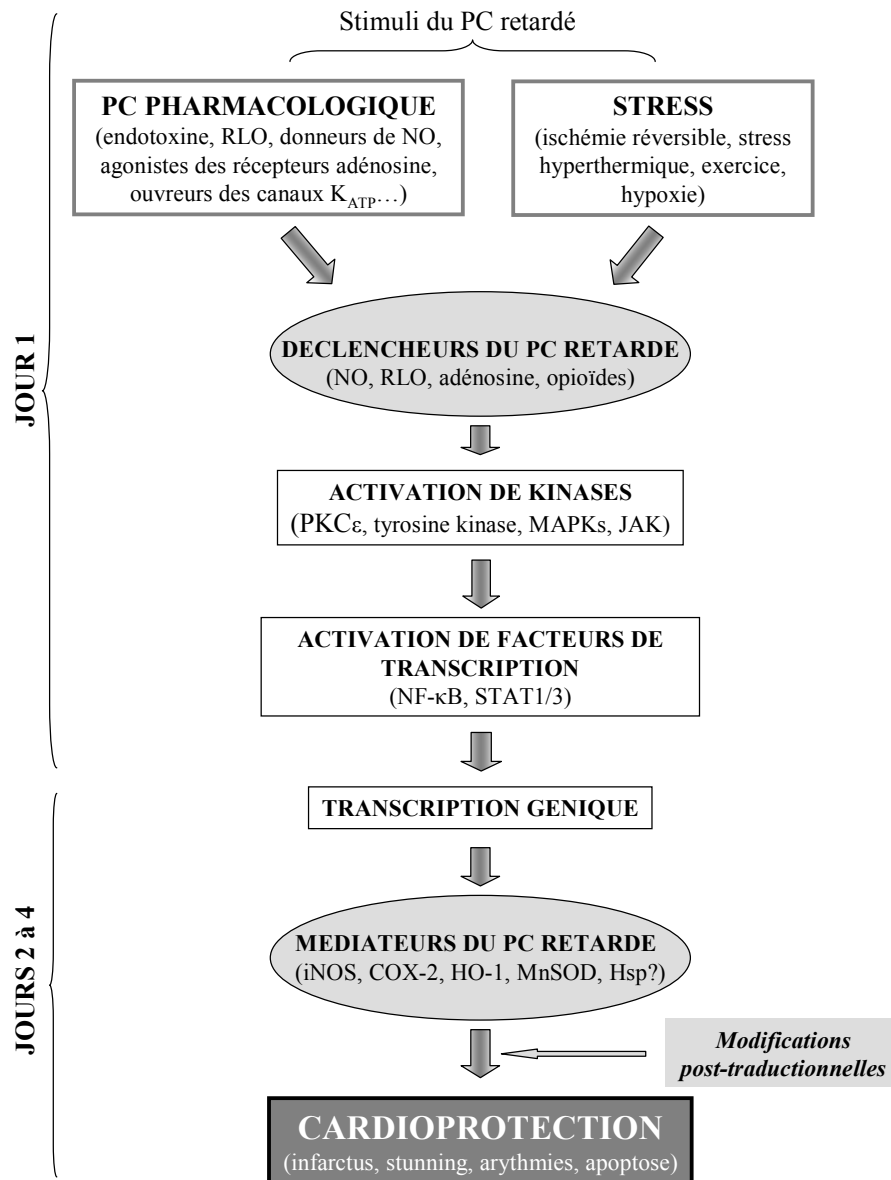


Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes cellulaires conduisant au PC retardé, d'après Stein [17].

1.2.2 Préconditionnement hypoxique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypoxie fait partie des stimuli capables d'induire un PC retardé contre des lésions causées par une séquence d'ischémie-reperfusion. Une hypoxie continue (HC) de courte durée, suivie d'une période de réoxygénation, est capable d'induire un PC classique ou retardé. En effet, une anoxie de 30 minutes (0% d'O₂) suivie d'une heure de réoxygénation améliore la viabilité des cardiomyocytes de souris placées en condition ischémique [26]. De plus, une séquence de 10 minutes d'hypoxie suivie de 10 minutes de réoxygénation induit une cardioprotection immédiate en améliorant la récupération fonctionnelle post-ischémique et en diminuant la nécrose cellulaire sur le cœur isolé de rat [27, 28]. L'HC peut également induire un PC retardé : des cœurs isolés de souris soumis à ce stimulus présentent une plus grande résistance à l'infarctus 24 heures après le stress [29].

Peu de données sont, toutefois, disponibles concernant les effets de l'hypoxie intermittente (HI) sur la susceptibilité du cœur à l'infarctus. Une étude récente rapporte qu'une seule heure d'HI est capable de protéger le cœur isolé de souris soumis 24 heures après à une ischémie-reperfusion (I/R), en améliorant la récupération fonctionnelle post-ischémique et en diminuant la taille de l'infarctus [30]. Cette étude suggère que l'HI est plus efficace que l'HC comme stimulus preconditionnant.

1.2.3 Voies de signalisation mises en jeu dans le PC retardé en général

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'hypoxie induit un PC retardé résultant d'une cascade complexe d'évènements cellulaires indispensables à la cardioprotection (Figure 3). Il existe peu d'études expliquant les voies de signalisation impliquées dans le PC hypoxique. Nous verrons donc dans ce chapitre, d'une façon générale, un certain nombre de déclencheurs et de médiateurs mis en jeu dans la réponse cardioprotectrice induite par le PC retardé (ischémique ou pharmacologique).

1.2.3.1 Les déclencheurs ou «triggers»

Le NO

L'oxyde nitrique (NO) est produit lors de l'oxydation par les NO synthases (NOS) de la L-arginine en L-citrulline [31]. Cette réaction (Figure 4), catalysée par les NOS, utilisent plusieurs substrats (le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et l'oxygène) et cofacteurs (la 6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH4), le flavine adénine dinucléotide (FAD) et le flavine adénine mononucléotide (FMN)). Trois isoformes de la NOS ont été identifiées : les NOS neuronale, endothéliale et inducible. La NOS neuronale, ou nNOS, est exprimée dans les neurones périphériques non-cholinergiques et non-adrénergiques. Elle entraîne une libération de NO calcium-dépendante. La NOS endothéliale, ou eNOS, est présente à l'état basal dans les cellules endothéliales, mais peut aussi être localisée dans d'autres types cellulaires, tels que les cardiomyocytes. Son activation est dépendante du calcium intracellulaire et peut être induite par divers mécanismes tels que les forces de cisaillement générées par le passage des éléments figurés sanguins, l'activation de protéines G, l'hypoxie ou par certaines substances telles que l'acétylcholine, la bradykinine ou l'histamine. La NOS inducible, ou iNOS, est calcium-indépendante. Son expression peut être induite par les médiateurs de l'inflammation dans différents types de cellules vasculaires, telles que les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses, ainsi que dans les macrophages.

Un inhibiteur non sélectif des NOS, le *N*^ω-nitro-L-arginine (L-NA), abolit l'effet protecteur du PC ischémique sur le stunning myocardique chez le lapin [32] ou sur la réduction de la taille de l'infarctus [33]. Il semble donc que l'effet cardioprotecteur du PC ischémique implique la formation de NO. D'autre part, il faut noter qu'un prétraitement avec des donneurs de NO (nitroglycérine, diéthylentriamine) en absence d'ischémie induit un effet protecteur retardé contre le stunning et l'infarctus, semblable à l'effet observé pendant le PC ischémique retardé [34, 35].

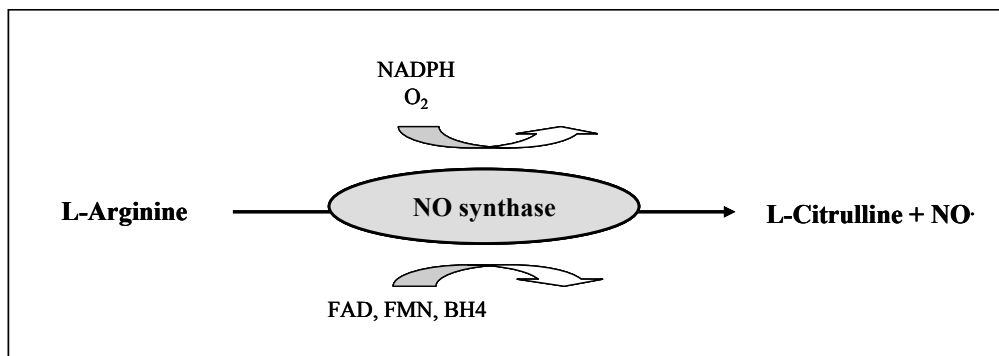


Figure 4 : Réaction de synthèse du NO. BH₄ : 6(R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide ; FMN : Flavine Adénine Mononucléotide ; NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Réduit.

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène

Dans les conditions basales, les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ces conditions, la balance antioxydant/prooxydant est en équilibre.

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 1.1.3), les RLO semblent très fortement impliqués dans la formation des lésions de la reperfusion [36]. Lors des premières minutes de reperfusion, la réoxygénation de la zone ischémisée entraîne la production importante de RLO, dans des proportions telles que les systèmes de défense semblent dépassés. Ceci est à l'origine d'un stress oxydant important.

Bien qu'un stress oxydant sévère soit cytotoxique, une production modérée de RLO peut moduler certaines fonctions cellulaires et déclencher des mécanismes d'adaptation [37].

En effet, le traitement de cœur de lapins par des RLO exogènes, avant une séquence d'ischémie-reperfusion, provoque un PC retardé contre le stunning [20], de plus le peroxyde d'hydrogène, administré avant une ischémie prolongée, confère une protection contre les arythmies de reperfusion chez le rat [38]. La production de RLO semble indispensable au développement du PC retardé. En effet, l'administration d'antioxydants (superoxyde

dismutase, catalase) pendant le PC ischémique abolit la protection retardée contre la sidération myocardique [39] chez le lapin. De plus, le mercaptopropionyl glycine (MPG), qui est un antioxydant puissant, prévient la protection retardée induite par le PC ischémique contre l'infarctus du myocarde [40] et les arythmies de la reperfusion [41]. L'effet du MPG a également été observé dans d'autres PC, comme celui induit par le stress hyperthermique [42] ou par les donneurs de NO [22]. Malgré leurs effets cytotoxiques, les RLO semblent donc jouer un rôle dans l'initiation de la cardioprotection retardée induite par ces différentes formes de PC.

Les opioïdes

Le terme opioïde désigne les substances dont le mode d'action ressemble à celui de la morphine, malgré des structures chimiques distinctes [43]. Les cellules myocardiques sont capables de synthétiser, de stocker et de libérer des opioïdes [44], et ceci de façon plus importante pendant des stress comme l'ischémie ou l'hypoxie [45]. Le cœur a la capacité de synthétiser trois types d'opioïdes ; les enképhalines, les endorphines et les dynorphines [46]. Des récepteurs aux opioïdes, couplés aux protéines G, ont été identifiés et différenciés en trois sous-unités : μ , κ , δ . Comme ces opioïdes sont libérés suite à un stress, il a été suggéré qu'ils pouvaient être impliqués dans la réponse protectrice du myocarde contre les lésions d'ischémie-reperfusion. Wu et collaborateurs ont montré, dans un modèle de cardiomyocytes de rat, une implication des récepteurs κ dans la cardioprotection retardée [47]. De plus, Fryer et collaborateurs, en administrant un agoniste des récepteurs δ aux opioïdes, ont diminué, 24 heures après l'administration, la taille de l'infarctus. Ils ont également aboli cette cardioprotection en administrant un antagoniste des récepteurs δ_1 aux opioïdes [24].

1.2.3.2 Voies de signalisation intracellulaire : les protéines kinases

L'activation de kinases semble ensuite être indispensable à la transduction du signal cardioprotecteur (Figure 3).

La PKC

La protéine kinase C (PKC) est impliquée dans la genèse du PC retardé. L'équipe de Yellon a montré qu'un inhibiteur de la PKC abolissait la cardioprotection induite par un PC ischémique [48] et que l'administration d'un activateur de la PKC était capable d'induire une cardioprotection 24heures plus tard [49]. L'implication de la PKC dans les mécanismes de PC retardé est clairement démontrée ; en revanche, la nature des isoformes impliquées soulève de nombreuses questions. Une activation (reflétée par la translocation de la protéine vers les compartiments membranaires) sélective des isoformes ϵ et η de la PKC a été observée dans des cœurs de lapin soumis à un PC ischémique, sans que l'activité PKC totale ne soit affectée [50]. D'autre part, l'inhibition de la translocation de la PKC ϵ par la chébérythrine bloque le développement du PC ischémique retardé contre le stunning, alors que l'inhibition de la translocation de la PKC η n'a aucun effet sur ce paramètre [51]. Il semble donc que c'est l'isoforme ϵ de la PKC qui soit responsable du développement de la protection retardée. Enfin, il a été montré qu'un donneur de NO, en l'absence d'ischémie, est capable d'induire un PC retardé et une activation sélective de la PKC ϵ indispensable au développement de la cardioprotection [52].

La PI3 kinase

La cascade de signalisation de la kinase phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3K) est activée en réponse à l'activation d'un grand nombre de récepteurs, notamment les récepteurs couplés aux protéines G. Cette voie de signalisation participe à un grand nombre de processus cellulaires en phosphorylant divers substrats. Notamment, il a été montré que la PI3K confère une protection contre les lésions dues à l'ischémie-reperfusion via la phosphorylation de la

sérine/thréonine protéine kinase Akt [53]. Plusieurs études suggèrent un rôle de la PI3K dans le préconditionnement myocardique. L'utilisation d'un inhibiteur de la PI3K (wortmannin) empêche l'amélioration de la récupération fonctionnelle déclenchée par le PC ischémique [54]. De plus, la wortmannin abolit complètement la protection contre l'infarctus 24 heures après le PC ischémique dans un modèle *in vivo* de lapin [55].

Les MAP kinases

En réponse à différents stress, une cascade de sérine/thréonine protéine kinases, regroupées sous le terme de Mitogen Activated Protein (MAP) kinases, est activée. Ces protéines, qui sont conservées entre les organismes multicellulaires, phosphorylent les résidus sérine et thréonine de protéines cibles, affectant ainsi l'expression des gènes, la mitose, le métabolisme et la mort cellulaire [56]. Parmi ces MAP kinases, la p38 MAP kinase et Erk1/2 (aussi appelée p42/44 MAP kinase) ont un rôle important dans la genèse d'un phénotype cytoprotecteur induit soit par des agents pharmacologiques soit par le PC ischémique. Il a été montré que le PC pharmacologique et l'ischémie entraînaient la phosphorylation, et donc l'activation, de la p38 MAP kinase conduisant ainsi à un effet protecteur [57, 58]. Quelques études ont montré l'implication de Erk1/2 dans le PC induit par l'adénosine [59, 60] et les opioïdes [61].

Les protéines kinases PKC, PI3K, p38 MAP kinase ainsi que Erk1/2 sont donc impliquées dans les voies de signalisation du préconditionnement retardé. Cependant, l'implication de ces protéines dans le PC induit par l'hypoxie restent à définir. Il faut noter que l'on peut considérer les protéines kinases comme des déclencheurs du PC retardé, quand, en bloquant leur action avant le PC, on abolit la cardioprotection.

1.2.3.3 Les médiateurs

Le PC retardé induit une augmentation de la synthèse de protéines myocardiques et contrairement au PC classique, le PC retardé nécessite une augmentation de la synthèse de nouvelles protéines et pas simplement l'activation de protéines pré-existantes [62]. L'amélioration de la tolérance du myocarde à l'ischémie se développe en 12 à 24 heures et dure 3 à 4 jours [49, 63], ce qui rend possible la synthèse et la dégradation de protéines cardioprotectrices. Plusieurs protéines sont proposées comme médiateurs de la protection induite par le PC retardé, parmi lesquelles la iNOS, les protéines de stress (Hsp) et les enzymes antioxydantes. Par ailleurs, il est de plus en plus évident que les canaux K_{ATP} sont impliqués comme médiateurs de la cardioprotection. Sera détaillée dans ce chapitre l'implication de la iNOS ainsi que des canaux K_{ATP} dans le PC retardé.

La NO synthase inductible – iNOS

Plusieurs études montrent que le NO joue un rôle important dans la médiation des effets cardioprotecteurs induits lors du PC ischémique [22, 64, 65]. Il semble que, dans ces mécanismes cardioprotecteurs, l'origine du NO soit préférentiellement dépendante de la NOS inductible (iNOS) puisque l'administration d'un inhibiteur spécifique de cette isoforme (aminoguanidine ou 1400W) abolit la protection myocardique induite par le PC ischémique [32, 64]. De plus, le PC ischémique retardé est associé à une surexpression de la iNOS chez la souris *in vivo* [66]. Enfin, il a été montré que les cardiomyocytes de souris expriment spécifiquement la iNOS pendant le PC retardé [67].

Le mécanisme précis par lequel le NO dérivé de la iNOS protège de l'ischémie reste à élucider, mais le NO induit l'activation de la guanylate cyclase soluble [68] et de la cyclo-oxygénase de type 2 [69].

Les canaux K_{ATP}

De nombreuses études suggèrent que l'ouverture des canaux potassiques dépendant de l'ATP (K_{ATP}) représente une étape finale dans la voie de signalisation induisant le PC retardé. Il existe deux sortes de canaux K_{ATP} , ceux présents au niveau du sarcolemme ($sarcK_{ATP}$) et ceux présents au niveau de la mitochondrie ($mitoK_{ATP}$) [70]. Ces canaux sont fermés par l'ATP et ouverts par les nucléotides diphosphates.

L'ouverture des canaux $sarcK_{ATP}$ induit une sortie de potassium (K^+) vers le milieu extracellulaire. Il se produit alors un raccourcissement du potentiel d'action, une hyperpolarisation et un relâchement de la fibre musculaire. L'implication des canaux K_{ATP} lors du PC ischémique a initialement été montrée par Gross et collaborateurs, qui, en utilisant le glibenclamide, ont bloqué les effets bénéfiques du PC ischémique [71]. Le glibenclamide bloque à la fois les canaux $sarcK_{ATP}$ et $mitoK_{ATP}$. A cette époque, l'existence d'un canal K_{ATP} au niveau de la mitochondrie n'avait pas encore été démontrée. Il était donc suggéré que l'effet protecteur du PC ischémique était dû à l'ouverture des canaux $sarcK_{ATP}$. D'un point de vue mécanistique, il était proposé que cette ouverture provoquait le raccourcissement du potentiel d'action [72] et une hyperpolarisation cellulaire à l'origine d'une diminution du contenu intracellulaire en calcium et d'une préservation du pool d'ATP. Cette théorie fut ébranlée lorsqu'il a été observé que le PC ischémique ou des ouvreurs des canaux K_{ATP} exerçaient leur effet cardioprotecteur en l'absence d'un raccourcissement du potentiel d'action [73-75].

Il a ainsi été proposé que des canaux K_{ATP} pouvaient exister au niveau de la membrane mitochondriale [76]. Dans ce cas, l'ouverture du canal provoquerait un flux d'ions K^+ du cytosol vers la matrice mitochondriale, entraînant une baisse du potentiel de membrane mitochondrial et un gonflement de la mitochondrie (l'entrée d'eau est osmotiquement liée à celle du K^+). L'équipe de Garlid est la première à avoir suggéré un rôle du canal $mitoK_{ATP}$ dans la cardioprotection [77]. L'implication de ces canaux dans le PC retardé a été démontrée en utilisant un inhibiteur spécifique des canaux $mitoK_{ATP}$, le 5 hydroxydécanoate (5-HD) [78]. Cependant, il reste difficile de répondre à la question : pourquoi l'ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ est-elle cardioprotectrice ?

A l'état basal, l'échangeur K^+/H^+ permet l'entrée d'un H^+ et la sortie d'un K^+ de la mitochondrie. L'influx et l'efflux de potassium (K^+) dans la matrice mitochondriale a pour rôle principal de réguler le volume mitochondrial [79]. L'ATPase mitochondriale synthétise de l'ATP grâce au potentiel de membrane et au gradient de proton. L'ischémie a plusieurs conséquences néfastes sur la mitochondrie : diminution du volume matriciel, consommation d'ATP par l'ATPase mitochondriale, modification du potentiel de membrane, surcharge calcique.

L'ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ induite par le PC ou des agonistes, provoque un influx de K^+ qui peut contrebalancer l'activité de l'échangeur K^+/H^+ et conduire à un gonflement de la mitochondrie [80]. Ce phénomène empêche la contraction de la matrice mitochondriale, préservant ainsi le métabolisme énergétique [77]. De plus, l'entrée de charges positives dans la matrice mitochondriale provoque une diminution du potentiel membranaire, ce qui diminue la surcharge calcique à l'intérieur de la mitochondrie [81]. Enfin, l'ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ semble être à l'origine du découplage de la respiration (chaîne de transport des électrons) et de la synthèse d'ATP (phosphorylation par l'ATPase) [82], permettant ainsi d'économiser les réserves intracellulaires en ATP. La diminution de la surcharge calcique mitochondriale semble à l'origine d'une diminution de l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) situé sur la membrane interne de la mitochondrie. Ce phénomène de « transition de perméabilité membranaire mitochondriale » est un processus qui conduit notamment, lorsque le pore est ouvert, à une fuite de molécules proapoptotiques. Expérimentalement, plusieurs études suggèrent que le PC ischémique peut moduler le PTP au cours de l'ischémie-reperfusion [83].

Le canal $mitoK_{ATP}$ joue donc un rôle important dans le PC en s'intégrant dans l'ensemble de la voie de signalisation. En effet, plusieurs études montrent que la phosphorylation, par les protéines kinases, des canaux ioniques (dont les canaux K_{ATP}), contrôle leur activité [84, 85]. Enfin, l'ouverture des canaux K_{ATP} semble être activée par la PKC pendant le PC ischémique [86, 87].

Il semble donc que la iNOS, la PKC ainsi que les canaux K_{ATP} soient des médiateurs importants de la cardioprotection retardée induite par les diverses formes de PC.

2 Objectif de ce travail

L'objectif principal de ce travail de thèse a été, dans un premier temps, de mettre en place un modèle de préconditionnement hypoxique. Par la suite, nous avons essayé de déterminer les mécanismes cardioprotecteurs induits par ce préconditionnement.

Les études et les résultats additionnels mentionnés dans ce manuscrit ne sont pas présentés de façon chronologique, mais de façon mécanistique. Toutes les techniques utilisées dans les différentes études sont détaillées dans la section matériel et méthodes ci-après. La section résultats regroupe les études qui ont été menées et les résultats additionnels qui ont été obtenus au cours de ce travail de thèse.

Dans un premier temps, nous présenterons les résultats de l'étude concernant la mise en place du modèle de PC hypoxique. Nous avons pour cela testé différentes durées et intensités d'hypoxie intermittente. Nous citerons également des résultats complémentaires nous ayant permis de valider ce modèle de PC retardé.

Ensuite nous décrirons les voies de signalisation mises en jeu dans la cardioprotection induite par le PC hypoxique. Par une approche pharmacologique et moléculaire, nous avons d'abord recherché des déclencheurs du PC hypoxique. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'implication de la PKC, du NO et de la iNOS, et enfin des canaux K_{ATP} comme médiateurs de la réponse cardioprotectrice induite par l'hypoxie intermittente.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Matériel biologique

Les expériences d'hypoxie aiguë sont réalisées sur des rats mâles de souche Wistar, et de poids compris entre 330 et 380 g. Les animaux sont placés dans des conditions constantes de température et d'humidité avec des cycles de 12 heures de jour/12 heures de nuit ; l'accès à l'eau et à la nourriture est libre.

Toutes les expériences ont été approuvées par la Direction des Services Vétérinaires de l'Isère, France.

Ces expériences ont été menées conformément à la loi française et aux directives des comités d'éthiques locaux pour la recherche sur l'animal.

3.2 Stress hypoxique

Le stimulus d'hypoxie intermittente (HI) utilisé est le suivant : cycles répétés d'une minute, composés de 40 secondes d'hypoxie (5% ou 10% d'O₂) et de 20 secondes de normoxie (21% d'O₂) (Figure 5).

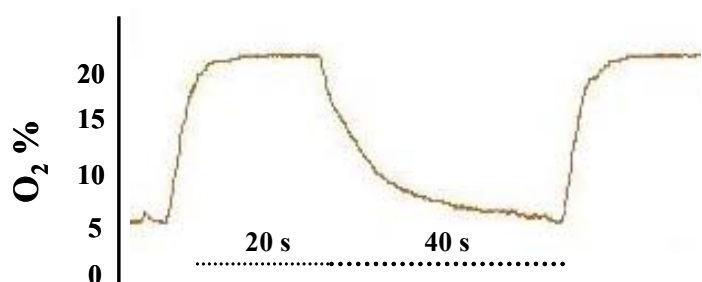


Figure 5 : Variation de la teneur O₂ à l'intérieur des cages (de 21 à 5%) au cours des cycles d'une minute d'HI.

Les animaux sont placés dans des enceintes où la teneur en oxygène (O_2) est abaissée par enrichissement du milieu en azote, c'est une hypoxie normobarique. Les rats sont soumis à une HI aiguë pendant 30 minutes ou 4 heures. Les animaux contrôles, appelés normoxiques, sont placés dans des enceintes similaires où la fermeture et l'ouverture des électrovannes ne contrôlent qu'une entrée d'air (Figure 6).

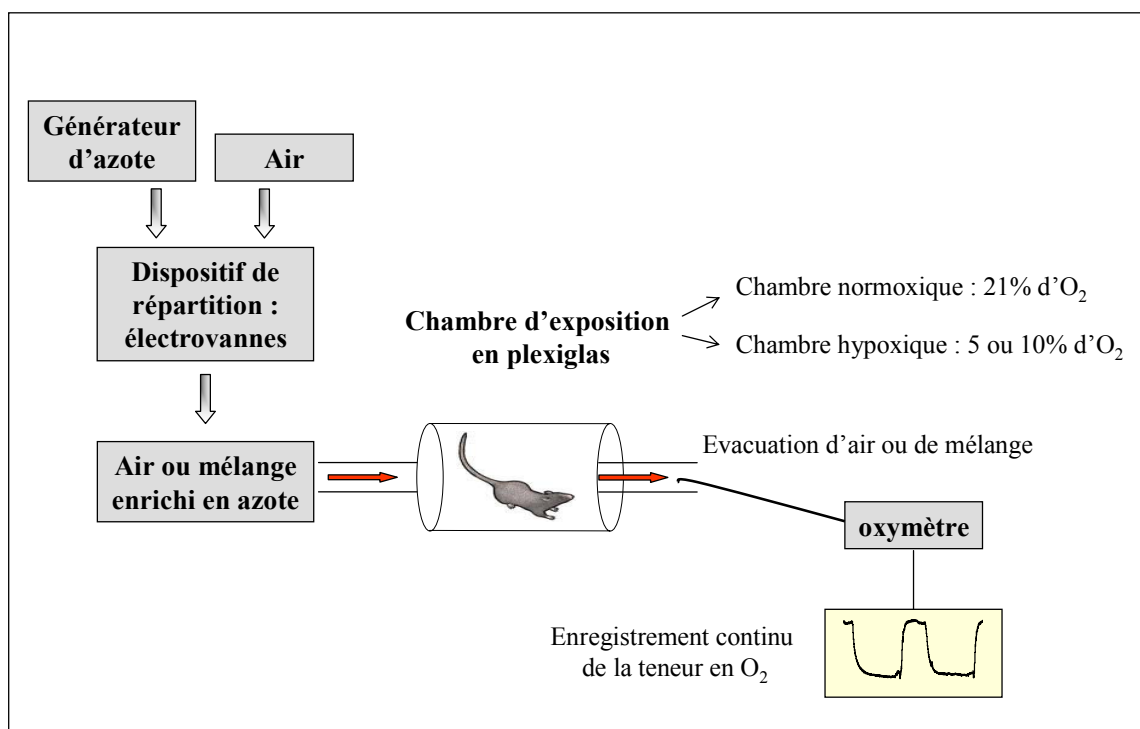


Figure 6 : Représentation schématique du dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente ou à la normoxie.

Certains rats sont soumis à une hypoxie continue où l'arrivée d'un mélange d'air et d'azote (10% O_2) est permanente. Tous les animaux sont ensuite replacés dans les conditions standard de l'animalerie. Le taux d' O_2 dans les enceintes est contrôlé tout au long du protocole d'hypoxie avec un analyseur de gaz (ML206 Gas Analyzer, AD Instruments).

3.3 Ischémie myocardique

3.3.1 Modèle de Langendorff

Vingt-quatre heures après l'HI, les rats sont anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg/kg, voie intrapéritonéale, i.p.) et reçoivent une injection par voie intraveineuse d'héparine (500 U/kg, i.v.) afin d'éviter la formation de caillots intra-coronariens lors du prélèvement du cœur. Le cœur est ensuite prélevé et immergé dans une solution de Krebs-Henseleit à 4°C pour stopper sa contraction. L'aorte est canulée et le cœur perfusé de façon rétrograde, à pression constante (100 cm d'eau soit 75 mmHg). Le dispositif de perfusion est constitué d'un réservoir de liquide relié à un piège à bulles et d'une enceinte thermostatée pour maintenir le liquide de perfusion à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Le liquide de perfusion est une solution de Krebs-Henseleit composée de :

NaCl 118 mM,	KCl 4,7 mM	MgSO ₄ 1,2 mM	Glucose 11 mM
NaHCO ₃ 25,2 mM	KH ₂ PO ₄ 1,2 mM	CaCl ₂ 2,5 mM	EDTA 0,5 mM

Cette solution est tamponnée à pH 7,4 et équilibrée par un mélange gazeux composé de 95% d'O₂ et de 5% de CO₂.

Un ballonnet (Hugo Sachs, n°4) rempli d'eau et relié à un capteur de pression est inséré dans le ventricule gauche via l'oreillette gauche pour mesurer la pression développée par le ventricule gauche (PDVG en mmHg). La pression télédiastolique du ventricule gauche (PTDVG) est ajustée entre 5 et 10 mmHg par gonflement du ballonnet.

La température du myocarde est maintenue à 37°C et est contrôlée au moyen d'une sonde thermique insérée dans le ventricule gauche.

La fréquence cardiaque (FC en bpm) et la PDVG sont enregistrées continuellement à l'aide d'un système d'acquisition (PC Lab 4S, AD Instrument). Les dérivées maximum (dP/dt Max) et minimum (dP/dt Min), représentant un indice de contractilité, sont déterminées tout au long du protocole. Le débit coronaire (DC exprimé en mL/min/g) est mesuré par recueil de l'effluent coronaire.

Après 20 minutes de stabilisation, une ischémie globale de 30 minutes est réalisée. La reperfusion est rétablie pendant 120 minutes afin de permettre le développement de l'infarctus. Cette durée de reperfusion est communément admise comme étant suffisante chez le rat pour induire une atteinte cellulaire irréversible.

Durant la reperfusion myocardique, les incidences des tachycardies et/ou fibrillations ventriculaires, définies selon les critères des Conventions de Lambeth [88], sont quantifiées.

3.3.2 Traitements pharmacologiques

Perfusion d'inhibiteurs 10 minutes avant l'ischémie dans le liquide de Krebs :

Tableau 1 : concentration des substances pharmacologiques perfusées avant l'ischémie.

Inhibiteurs	Concentrations	Cibles	Références
L-NAME	3 μ M	eNOS, iNOS, nNOS	[89]
5-HD	100 μ M	Canaux K_{ATP} mitochondriaux	[90]
Paxilline	1 μ M	Canaux KCa	[91]
Aminoguanidine	100 μ M	iNOS	[92]
Chélérythrine	5 μ M	PKC	[93]

Injection intrapéritonéale d'inhibiteurs, avant le stress hypoxique :

Tableau 2 : concentration des substances pharmacologiques injectées avant le stress HI.

Inhibiteurs	Doses	Cibles	Références
Wortmannin	15 μ g/kg	PI3 kinase	[94]
Chélérythrine	5 mg/kg	PKC	[95]
SB203580	1 mg/kg	p38 MAP kinase	[61]
PD98059	0,5 mg/kg	MEK-1	[96]

3.3.3 Détermination de la taille de l'infarctus

A la fin de la reperfusion, le cœur est débarrassé de ses tissus connectifs et de ses oreillettes puis congelé à -20°C afin de faciliter sa découpe en tranches transversales de 1 mm d'épaisseur de l'apex vers la base (5-7 tranches par cœur). Ces tranches sont ensuite incubées 10 minutes à 37°C dans du chlorure de triphenyltetrazolium 1% (tampon phosphate, pH 7,4), puis fixées dans une solution de formaldéhyde 10%, afin de distinguer le tissu viable du tissu nécrosé. La taille de l'infarctus est exprimée en pourcentage de la taille des ventricules. Ces superficies sont déterminées par planimétrie (logiciel Image Tool[®], NIH).

3.4 Western immunoblot

3.4.1 Préparation des échantillons

Vingt-quatre heures après l'hypoxie, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital sodique (60 mg/kg, i.p.) et ils reçoivent une administration d'héparine (500 U/kg, i.v.). Les cœurs sont prélevés rapidement, rincés avec une solution de Krebs-Henseleit et clampés dans de l'azote liquide à l'aide d'une pince de Wollenberger.

Les échantillons tissulaires congelés sont homogénéisés au polytron (3 fois 20 secondes) dans 10 volumes de tampon de lyse (RIPA). Les homogénats obtenus sont centrifugés 20 minutes à 4°C, à 13 000 rpm. Le surnageant obtenu comprend les protéines totales. Il est aliquoté et congelé à -80°C en vue du dosage des protéines et des expériences de western blot.

- Tampon de lyse (RIPA):

50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% détergent (Nonidet P-40), 0,5% sodium déoxycholate, une pastille d'inhibiteur de protéases (Complete, Roche[®]) est ajoutée avant l'utilisation. Le pH de la solution est ajusté à 7,4.

3.4.2 Dosage des protéines

La méthode de Pierce, compatible avec la présence de détergent dans les échantillons, a été utilisée pour la quantification des protéines. Ce dosage est basé sur la réduction du Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines et la réaction du Cu^+ avec l'acide bicinchoninique (BCA). Le complexe coloré BCA- Cu^+ présente une très forte absorbance à 562 nm, qui est linéaire avec l'augmentation des concentrations protéiques.

Une gamme étalon d'albumine bovine est réalisée puis les échantillons sont testés (25 μL d'échantillons pour 200 μL de réactif). Après 30 minutes d'incubation à 37°C avec le réactif kit de dosage BCA Pierce, la densité optique est mesurée à 562 nm. Les concentrations protéiques sont exprimées en mg.mL^{-1} .

3.4.3 Western immunoblot

Des quantités identiques de protéines des surnageants (de 50 à 70 μg) sont séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS PAGE), 8% pour les protéines de haut poids moléculaire ($\text{PM} > 100 \text{ kDa}$) et 10% pour celles de bas poids moléculaire ($\text{PM} < 100 \text{ kDa}$). Un marqueur de poids moléculaire ainsi qu'un témoin positif sont mis à migrer simultanément avec les échantillons. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) pendant une heure à un ampérage qui varie selon la taille de la membrane (0,8 mA/cm^2). Après une saturation des sites non spécifiques d'une heure dans un tampon de blocage (TBS 1X, Tween 20 0,1% et lait déshydraté écrémé 5%), les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire spécifique (tableau 3) sous agitation, toute la nuit à 4 °C. Puis l'anticorps secondaire correspondant, couplé à une peroxydase, est mis au contact de la membrane une heure à température ambiante. La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est utilisée comme contrôle de charge. Un système luminescent (Uptilight HRP Blot Chemiluminescent Substrate[®], Interchim) est ensuite utilisé pour la mise en évidence autoradiographique.

La photographie de la membrane est scannée, puis l'intensité de chaque bande est quantifiée par le logiciel Image J[®] et exprimée en unité arbitraire.

Tableau 3 : dilution et tampon de dilution des anticorps primaires utilisés pour les Western blots.

Anticorps primaire	Dilution	Tampon de dilution
Akt	1/1000	BSA 5%
Phospho Akt	1/1000	BSA 5%
p38 MAP kinase	1/1000	BSA 5%
Phospho p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182)	1/1000	BSA 5%
Erk1/2 MAP kinase	1/40000	lait 5%
Phospho Erk1/2 MAP kinase (Thr202/Tyr204)	1/1000	BSA 5%
iNOS	1 µg/ml	lait 5%
eNOS	1/1000	BSA 5%
phospho eNOS	1/1000	BSA 5%
nNOS	1/1000	BSA 5%
phospho nNOS	1/1000	BSA 5%
GAPDH	1/1000	lait 5%

3.5 Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Sigma Stat® (version 3.1). Les paramètres hémodynamiques ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs (traitement et temps). Lorsque celle-ci s'est révélée significative, le test de Bonferroni a été réalisé a posteriori. Concernant les tailles d'infarctus, les données ont été comparées à l'aide d'une analyse de variance uni-factorielle ou à deux facteurs en fonction des modalités appliquées aux différents groupes (hypoxie, traitement). Le risque d'erreur de 1^{ère} espèce α est fixé à 5% et le degré de significativité est fixé à 5% ($p < 0,05$).

4 Résultats

4.1 Mise en place du protocole de PC hypoxique

4.1.1 Etude 1 : L'hypoxie intermittente aiguë améliore la tolérance à l'ischémie chez le rat

“Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia”

P.C. Béguin, M. Joyeux-Faure, D. Godin-Ribuot, P. Lévy, and C. Ribuot

Journal of Applied Physiology. 99: 1064–1069, 2005.

Résumé

L'effet protecteur de l'hypoxie a été étudié sur un certain nombre de fonctions physiologiques impliquant des organes tels que le foie, le cerveau ou le cœur [97].

Au niveau du système cardiovasculaire, plusieurs études ont été menées. Il a été observé que l'hypoxie stimule l'angiogénèse dans un modèle d'infarctus chronique chez le rat, et ceci de façon suffisante pour préserver la fonction contractile [98]. De plus, le préconditionnement hypoxique améliore la récupération fonctionnelle post-ischémique sur le cœur de rat soumis à une ischémie globale *in vitro* [99]. Cette récupération s'accompagne d'une diminution de la surcharge calcique classiquement observée à la reperfusion [100]. Xi et collaborateurs [29] ont montré qu'une hypoxie de 4 heures était capable de préconditionner le myocarde en réduisant, 24 heures après, la taille de l'infarctus sur le cœur isolé de souris. L'hypoxie continue aiguë peut être considérée comme un PC retardé, cependant, peu de données sont disponibles concernant les effets de l'HI. Une HI d'une heure seulement est capable de protéger le cœur isolé de souris soumis, 24 heures après, à une ischémie-reperfusion (I/R) [30]. Aucune information concernant l'effet de l'HI aiguë sur le développement de l'infarctus chez le rat n'est disponible. L'objectif de cette étude était donc d'étudier les conséquences de l'HI aiguë sur la susceptibilité myocardique à l'infarctus chez le rat.

Ce travail montre pour la première fois qu'une exposition pendant 4 heures à une HI avec 10% d'O₂ réduit significativement la taille de l'infarctus par rapport au groupe contrôle normoxique. En revanche, un stimulus de 30 minutes ou une hypoxie continue de 4 heures à 10% n'a aucun effet sur la taille de l'infarctus. De plus, une HI de 4 heures à 5% d'O₂ augmente la taille de l'infarctus, réduit la PDVG et la récupération fonctionnelle par rapport au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que l'HI aiguë, selon sa durée et selon son intensité, peut induire une protection ou avoir un effet délétère sur le myocarde de rat.

Dans cette étude, nous avons également étudié, par une approche pharmacologique, quels pouvaient être les médiateurs de cette cardioprotection. Les résultats obtenus seront discutés ultérieurement dans la section 4.2.2.

Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia

P. C. Béguin, M. Joyeux-Faure, D. Godin-Ribuot, P. Lévy, and C. Ribuot

Laboratoire HP2, Hypoxie Physio-Pathologie Respiratoire et Cardiovasculaire, Equipe d'Accueil Ministère de la Recherche, Equipe Soutenue par la Région et l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble I, La Tronche, France

Submitted 18 January 2005; accepted in final form 3 May 2005

Béguin, P. C., M. Joyeux-Faure, D. Godin-Ribuot, P. Lévy, and C. Ribuot. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol* 99: 1064–1069, 2005. First published May 5, 2005; doi:10.1152/jappphysiol.00056.2005.—In this study, we investigated the influence of depth and duration of intermittent hypoxia (IH) on the infarct size development in isolated rat heart. The role of nitric oxide synthase (NOS) and ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channel was also studied. Wistar male rats were exposed to IH [repetitive cycles of 1 min, 40 s with inspired oxygen fraction (FI_{O_2}), 5 or 10%, followed by 20-s normoxia], during 30 min or 4 h. Another group was exposed to 4 h of continuous hypoxia with 10% FI_{O_2} . Twenty-four hours later, their hearts were isolated and subjected to a 30-min no-flow global ischemia-120-min reperfusion sequence. For some hearts, *N*^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (a non-selective inhibitor of NOS) or 5-hydroxydecanoic acid (5-HD) (a selective mitochondrial K_{ATP} blocker) was infused before ischemia. Infarct size (in percentage of ventricles) was significantly reduced by prior IH for 4 h (10% FI_{O_2}) (21.8 ± 3.1 vs. $33.5 \pm 2.5\%$ in sham group). This effect was abolished by L-NAME or 5-HD. Infarct size was not different in groups subjected to either 30 min of IH or to continuous hypoxia compared with sham group. In contrast, IH for 4 h (5% FI_{O_2}) significantly increased infarct size (45.1 ± 3.6 vs. $33.5 \pm 2.5\%$ in sham group). Acute IH for 4 h with a minimal FI_{O_2} of 10% induced a delayed preconditioning against myocardial infarction in the rat, which was abolished by NOS inhibition and mitochondrial K_{ATP} channel blockade. Depth, duration, and intermittence of hypoxia appeared to be critical for cardioprotection to occur.

ischemia-reperfusion; infarction; K_{ATP} channel; nitric oxide

CONTINUOUS HYPOXIA (CH) IS known to be an early preconditioning (PC) stimulus. Thus, in neonatal mouse cardiomyocytes, prior hypoxia (0% O_2 for 30 min and 1 h reoxygenation) improves cellular viability following lethal ischemia (15). Moreover, isolated rat hearts submitted to an anoxia (10 min)-reoxygenation (10 min) sequence show a preserved mechanical function and a reduced myocardial necrosis following ischemia-reperfusion (9, 10, 16). CH (10% O_2 for 4 h) is also able to induce delayed cardioprotection. Indeed, isolated hearts from mice submitted to this stimulus are more resistant to infarction, 24 h later (26). Moreover, in a rat model of permanent occlusion, it decreases infarct size as a result of myocardial angiogenesis (22). In contrast, little is known about the effects of intermittent hypoxia (IH) on heart's sensitivity to infarction. A recent study in mice has shown that only 1 h of IH (5 cycles of 6% O_2 for 6 min followed by 21% O_2 for 6 min) is able to prevent myocardial dysfunction and infarct

injury produced 24 h later by an ischemia-reperfusion sequence (8). This study suggests that IH is more efficient than CH as a PC trigger.

Nitric oxide (NO) is today well known as a mediator of various forms of delayed PC (6). NO formation mediates the delayed ischemic PC against both myocardial stunning (7) and infarction in the rabbit (12, 24). Indeed, administration of NO synthase (NOS) inhibitor 24 h after ischemic PC abolishes the delayed cardioprotection. The mechanism of hypoxic PC could be similar to the ischemic one and also implicate NO. Indeed, the cardioprotective effects of hypoxic and ischemic PC were described to be not additive, suggesting that they may share the same signaling pathway (18).

Many studies have shown that high-altitude hypoxia, another model of IH, might have cardioprotective effects against ischemic injury similar to those observed in ischemic PC. Indeed, this sort of IH protects myocardium by increasing coronary circulation and angiogenesis (29) and reduces incidence of arrhythmias (2). Among mechanisms underlying this phenomenon, ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels play a critical role (2, 19). Those channels seem also to mediate the cardioprotective effect induced by CH in rabbit (3, 4). K_{ATP} channels could also play a role in the acute IH-induced cardioprotection.

The aim of the present study was to examine the influence of 1) two depths of IH, 2) two durations of IH, and 3) the role of repeated reoxygenation on infarction susceptibility assessed in isolated rat hearts, 24 h after the hypoxic stress. We also investigated the role of NOS and K_{ATP} channel in the mechanism underlying IH-induced cardioprotection. Thus, 24 h after IH, we tested the effect of the nonselective NOS inhibitor *N*^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and the mitochondrial K_{ATP} channel blocker 5-hydroxydecanoic acid (5-HD) on infarct size development in the isolated rat heart.

METHODS

This investigation conforms with French law and local ethical committee guidelines for animal research. The protocol received approval from the Direction des Services Vétérinaires de l'Isère, France. Experiments were conducted on adult male Wistar rats (weight range 330–380 g) from Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) housed in controlled conditions and provided with standard rat chow.

IH protocol. During IH, the animals were housed in custom-made identical cylindrical Plexiglas chambers (length 28 cm, diameter 10 cm, volume 2.2 liters) with tightly fitted lids. A timed solenoid valve was used to distribute pure nitrogen to each chamber at a flow that was adjusted to reduce the ambient inspired oxygen fraction (FI_{O_2}) to 5 or

Address for reprint requests and other correspondence: C. Ribuot, Laboratoire HP2, Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire, EA3745, ESPRI INSERM, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Grenoble I, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France (E-mail: Christophe.Ribuot@ujf-grenoble.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

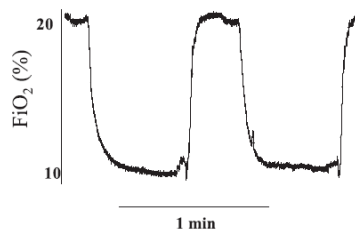


Fig. 1. Representative trace of the atmospheric changes that occurred during exposure to intermittent hypoxia (IH). Inspired oxygen fraction (FiO_2) was determined by continuous sampling from the chamber using an O_2 analyzer. IH was achieved by flushing nitrogen into the chamber until the O_2 concentration reached 10%. Hypoxia was maintained for 40 s, after which oxygen was flushed into the chamber to reestablish normoxia.

10% for 40 s. This was followed by infusion of compressed air, allowing a gradual return (over 20 s) of ambient air to a FiO_2 of 21%. The 5% depth was chosen to correspond with the O_2 desaturation observed in patients with obstructive sleep apnea syndrome. The 10% depth was chosen arbitrarily to investigate a less severe stress. This 1-min cycle was repeated for 30 min or 4 h. In parallel to nitrogen distribution, compressed air at the same flow rate was distributed to sham chambers to submit sham animals to similar noise and airflow disturbances. A dampening device at the chamber intake was used to dissipate the airstream, avoiding direct gas jets.

The level of FiO_2 in the chambers was controlled throughout the hypoxia protocol by using a Beckman OM11 O_2 analyzer (Fullerton, CA). Figure 1 provides an illustration of the FiO_2 profile produced by our IH protocol.

Experimental groups. Ten groups were subjected to a protocol summarized in Fig. 2. Twenty-four hours before the ischemia-reperfusion sequence, the rats were placed in the Plexiglas chambers and exposed to the following stimuli.

The following three groups were exposed to 4 h of normoxia or IH: 1) S 4h group (sham rats; $n = 10$), normoxic cycles (21% FiO_2); 2) IH5 4h group ($n = 8$), IH cycles with a minimal FiO_2 of 5% during hypoxia; 3) IH10 4h group ($n = 11$), IH cycles with a minimal FiO_2 of 10% during hypoxia.

The following four groups infused with different pharmacological antagonists were previously submitted to 4 h of normoxia or IH. Two groups were infused with the NOS inhibitor L-NAME [3 μ M (28)] during 10 min before no-flow global ischemia: 1) S + L-NAME group ($n = 7$), normoxic cycles (21% FiO_2); 2) IH10 + L-NAME group ($n = 7$), IH with a minimal FiO_2 of 10% during hypoxia. Two groups were infused with the mitochondrial K_{ATP} channel blocker 5-HD [100 μ M, (11)] during 10 min before no-flow global ischemia: 3) S + 5-HD group ($n = 6$); 4) IH10 + 5-HD group ($n = 6$).

The two following groups were exposed to a 30-min IH: 1) S 30min group ($n = 6$), normoxic cycles during 30 min (21% FiO_2); 2) IH10 30min group ($n = 7$), IH cycles during 30 min with a minimal FiO_2 of 10% during hypoxia.

One last group was exposed to CH during 4 h with a 10% FiO_2 (CH group, $n = 7$).

Ischemia-reperfusion protocol. Twenty-four hours after IH, the rats were anesthetized with 60 mg/kg ip pentobarbital sodium and treated with heparin (500 IU/kg iv). Hearts were rapidly excised and immersed in 4°C Krebs-Henseleit buffer solution (in mM: 118.0 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 $MgSO_4$, 25.2 $NaHCO_3$, and 11.0 glucose). The aortic stump was cannulated, and the heart was perfused retrogradely using the Langendorff technique at a constant pressure (75 mmHg) with oxygenated Krebs-Henseleit buffer, as previously described (14). A water-filled latex balloon (Hugo Sachs, no. 4), coupled to a pressure transducer, was inserted into the left ventricular cavity via the left atrium for pressure recording. Left ventricular end-diastolic pressure was adjusted between 5 and 10 mmHg. Myocardial temperature was measured by a thermoprobe inserted into the left ventricle and was maintained constant close to 37°C. After 20 min of stabilization, no-flow global ischemia was induced by stopping the perfusion for 30 min. Thereafter, the heart was reperfused for 120 min. Coronary flow (CF) was measured periodically throughout the ischemia-reperfusion procedure, by collecting the effluent; it was then expressed in milliliters per minute per gram. Heart rate (HR), left ventricular developed pressure (LVDP = difference between left ventricular systolic pressure and left ventricular end-diastolic pressure), and maximal rate of left ventricular pressure rise (dP/dt_{max}) and fall (dP/dt_{min}) were continuously recorded (PC Lab 4S, AD Instruments). At the end of the ischemia-reperfusion protocol, the atria were removed, and the heart was frozen at -20°C for 10 min. It was then cut into 2-mm transverse sections from apex to base (6–7 slices/heart). Once thawed, the slices were incubated at 37°C with 1% triphenyltetrazolium chloride in phosphate buffer (pH 7.4) for 10 min, fixed in 10% formaldehyde solution, and photographed. Incubation avoids a possible overestimation of infarct size due to no-reflow phenomenon. Area of infarcted tissue was measured by using a computerized planimetric technique (Image Tool for Windows) and expressed as a percentage of both right and left ventricular area. According to this method, the necrosis area corresponds to the zone not stained by the triphenyltetrazolium chloride.

Exclusion criteria. Only hearts with CF \leq 20 ml/min and LVDP > 70 mmHg at the end of the stabilization period were included in this study.

Moreover, because of a recording problem for one rat in the S 4h group, the hemodynamic data represent a mean of 9 points, and the infarct size data a mean of 10 points.

Materials. All reagents were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

Statistical analysis. Hemodynamic and infarct size data are presented as means \pm SE. Infarct size values were compared by using one-way ANOVA. Hemodynamic data were analyzed by using a two-way repeated-measures ANOVA. Post hoc multiple comparisons were performed by using Tukey tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

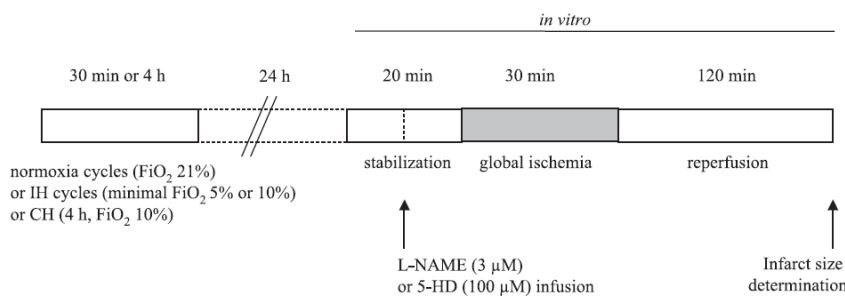


Fig. 2. Experimental protocol. Rats were submitted to either normoxia, IH during 30 min or 4 h, or continuous hypoxia (CH). Subsequently, all animals were allowed to recover for 24 h. Then, after a 20-min stabilization period, a 30-min no-flow global ischemia followed by a 120-min reperfusion was performed *in vitro*. Some hearts were infused with either N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 3 μ M), a nonselective inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), or 5-hydroxydecanoic acid (5-HD; 100 μ M), a selective mitochondria ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) blocker for 10 min before ischemia.

Table 1. Hemodynamic parameters of hearts from rats submitted to two durations of intermittent hypoxia (10% inspired oxygen fraction)

	S 30min	IH10 30min	S 4h	IH10 4h
<i>n</i>	6	7	9	11
CF, %				
R15	62±2	66±5	62±3	70±6
R60	48±2	50±5	52±4	51±5
R120	38±5	45±9	41±3	44±4
HR, %				
R15	75±2	68±6	81±6	67±5
R60	106±5	73±5	89±6	76±4
R120	93±5	75±6	85±7	76±5
LVDP, %				
R15	56±11	77±20	83±13	90±10
R60	61±8	59±11	74±13	97±10
R120	42±8	53±12	50±6	66±7
RPP, %				
R15	42±8	52±15	65±9	62±9
R60	65±10	46±12	63±9	64±9
R120	40±9	40±10	43±9	52±7
dP/dt _{max} , %				
R15	52±10	70±20	61±10	73±8
R60	69±14	62±14	62±10	77±8
R120	52±12	56±13	43±5	63±6
dP/dt _{min} , %				
R15	60±10	76±31	70±11	77±10
R60	71±14	68±18	58±8	77±9
R120	55±11	45±10	39±4	56±6

Values are means ± SE, expressed as percentage of values at 20 min of stabilization; *n*, no. of rats. CF, coronary flow; HR, heart rate; LVDP, left ventricular developed pressure; RPP, rate-pressure product; dP/dt_{max} and dP/dt_{min}: maximal rate of left ventricular rise and fall, respectively, expressed as percentage of stabilization values; R15, R60, and R120: reperfusion at 15, 60, and 120 min, respectively. See METHODS for explanation of groups.

RESULTS

Effects of the duration of IH. Hemodynamic data summarized in Table 1 showed no statistically significant difference in CF, HR, LVDP, rate-pressure product (RPP), and dP/dt_{max} during stabilization and ischemia-reperfusion periods, whatever the group observed. Likely, as observed in Fig. 3, the infarct size was similar in groups exposed to a 30-min IH (35.3 ± 6.7%) or normoxia (36.5 ± 4.0%). However, following 4 h of IH, the infarct size was significantly lower in hearts from rats exposed to 10% FiO₂ (21.8 ± 3.1%) compared with those from their respective normoxic controls (33.5 ± 2.5%).

Effects of the depth of IH. As shown in Table 2 and Fig. 4, there was no statistically significant difference in all of the studied hemodynamic parameters 24 h after 4 h of normoxia or IH (10% O₂) or CH (10% O₂). In contrast, IH with a minimal FiO₂ of 5% induced a decrease in LVDP (Fig. 4A) and RPP (Fig. 4B) and an increase in the infarct size (Fig. 5) (45.1 ± 3.6%) compared with the normoxic group (33.5 ± 2.5%). Four hours of CH at 10% FiO₂ did not modify infarct size (33.4 ± 7.0% in CH group) compared with normoxic exposure (Fig. 5).

Effects of pharmacological antagonists' infusion. Infusion of L-NAME had no effect on hemodynamic parameters (CF, HR, LVDP, RPP, dP/dt_{max}, and dP/dt_{min}), as summarized in Table 3, nor on infarct size, as illustrated in Fig. 6. However, 5-HD infusion decreased LVDP and dP/dt_{max} (Table 3) in the IH10 + 5-HD group compared with the IH10 4h group at 15 min of reperfusion without altering infarct size (Fig. 6). Ben-

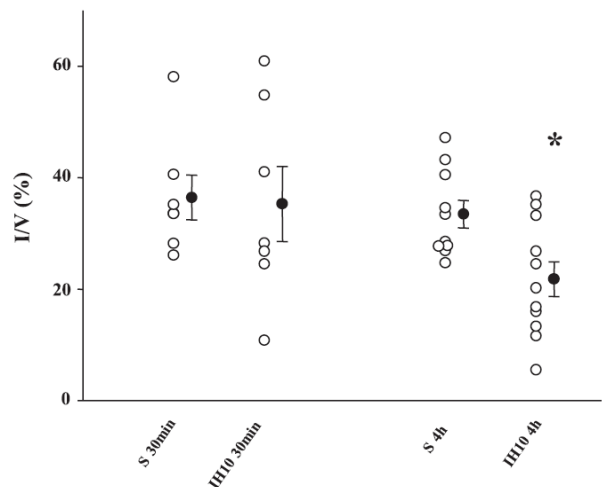


Fig. 3. Infarct size (I) expressed as a percentage of ventricles (V) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, in groups exposed for 30 min or 4 h to IH (10% FiO₂) or normoxia. ○, Individual values; ●, means ± SE. See METHODS for explanation of groups. **P* < 0.05 vs. the other groups using a one-way ANOVA.

eficial effect of PC by 4 h of IH (FiO₂ of 10%) was abolished by L-NAME (33.3 ± 4.0%) or 5-HD (35.5 ± 4.3%) infusion.

DISCUSSION

IH as a PC stimulus. We have demonstrated for the first time that exposure of rats to brief episodes of IH with 10% O₂

Table 2. Hemodynamic parameters of hearts from rats submitted to two depths of hypoxia and to continuous hypoxia during 4 h

	S 4h	IH10 4h	IH5 4h	CH
<i>n</i>	9	11	8	7
CF, %				
R15	62±3	70±6	60±3	70±9
R60	52±4	51±5	49±3	61±9
R120	41±3	44±4	45±7	48±7
HR, %				
R15	81±6	67±5	69±8	74±3
R60	89±6	76±4	87±3	82±5
R120	85±7	76±5	87±6	76±4
LVDP, %				
R15	83±13	90±10	59±4*	62±9
R60	74±13	97±10	46±6*	67±8
R120	50±6	66±7	28±4*	46±6
RPP, %				
R15	65±9	62±9	41±6*	44±5
R60	63±9	64±9	40±6*	55±6
R120	43±9	52±7	24±4*	34±3
dP/dt _{max} , %				
R15	61±10	73±8	46±4†	47±8
R60	62±10	77±8	42±6†	57±5
R120	43±5	63±6	26±3†	39±5
dP/dt _{min} , %				
R15	70±11	77±10	54±6	49±8
R60	58±8	77±9	41±5†	49±4
R120	39±4	56±6	24±3†	34±4

Values are means ± SE, expressed as percentage of values at 20 min of stabilization; *n*, no. of animals. **P* ≤ 0.05 vs. S 4h and IH10 4h. †*P* ≤ 0.05 vs. IH10 4h.

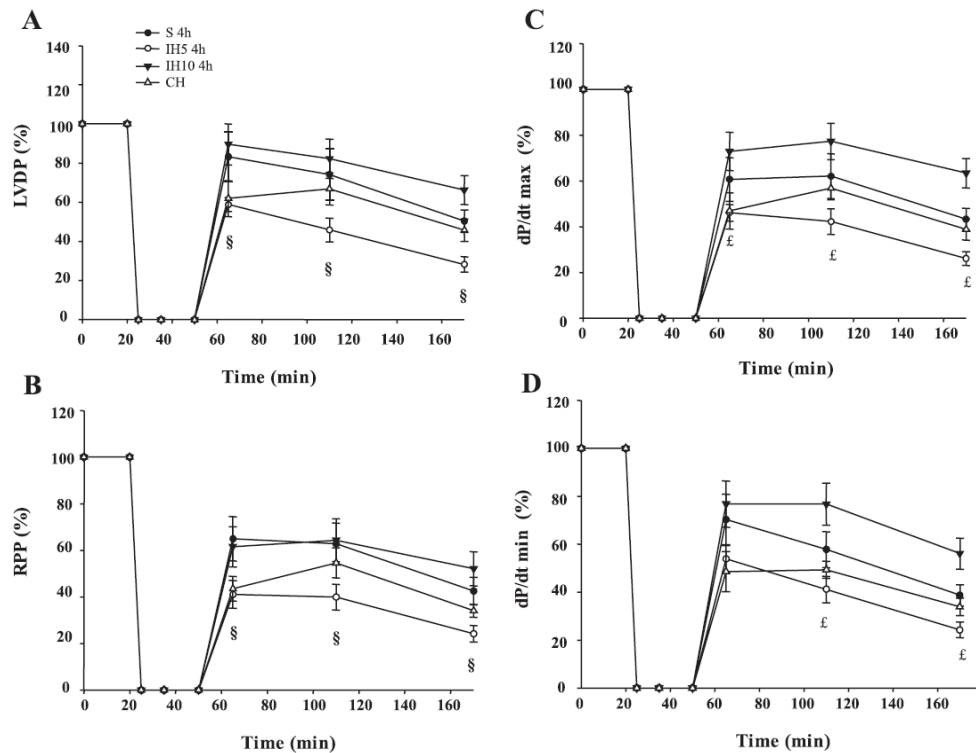


Fig. 4. Effect of the depth of IH on hemodynamic parameters. Hearts from rats submitted to either normoxia, IH (5 or 10% $F_{I_{O_2}}$), or CH during 4 h were perfused in Langendorff mode with Krebs-Henseleit buffer. After 20 min of stabilization, hearts were subjected to 30 min of no-flow global ischemia followed by 120 min of reperfusion. Left ventricular developed pressure (LVDP; A), rate-pressure product (RPP; B), and maximal rate of left ventricular pressure rise (dP/dt_{max} ; C) and fall (dP/dt_{min} ; D), expressed as percentage of values at 20 min of stabilization, were monitored continuously. $\$P < 0.05$, IH5 4h group vs. S 4h group and IH10 4h group. $\#P \leq 0.05$ vs. IH10 4h group.

induced protection against myocardial infarction, induced by total and global ischemia and reperfusion in isolated perfused heart, 24 h later. We have also demonstrated that exposure to CH during the same duration and depth had no effect. This second observation is in contrast with previous studies in rats (22) and mice (26), reporting that continuous exposure to 10% O_2 for 4 h resulted in delayed cardioprotection. This discrepancy could be explained in the first case by the ischemic model used (permanent left anterior descending coronary artery occlusion) to produce myocardial infarction and, in the second case, by species specificity in infarction susceptibility. Our study showed that intermittence of hypoxia, and hence reoxygenation, was essential to protect rat myocardium against infarction. One potential mechanism underlying this delayed cardioprotection could be the formation of reactive oxygen species (ROS), during the hypoxia-reoxygenation alternation. Indeed, ROS generated during alternation of hypoxia and reoxygenation appear to play a key role in the effects of IH on carotid body function and gene expression (21). Moreover, ROS are possibly involved in the mediation of cardioprotection conferred by many other forms of delayed PC, such as ischemic PC (23, 27) or heat stress (1).

Role of the duration of IH. We also showed that the delayed cardioprotection induced by IH is time dependent. After 4-h exposure, we reported a significant infarct size reduction, whereas a shorter 30-min exposure was ineffective. We can

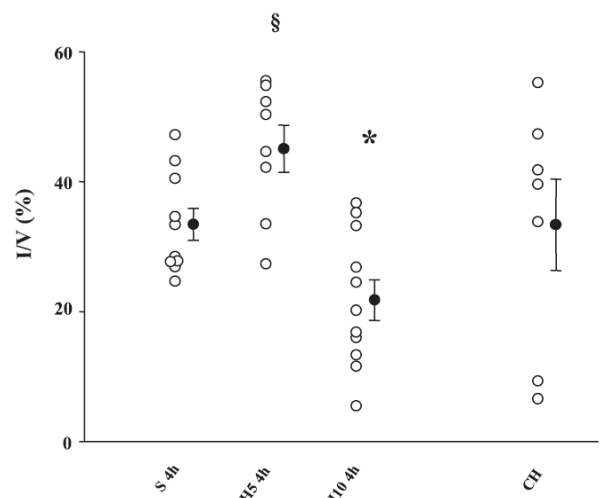


Fig. 5. Infarct size (I/V) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, in groups submitted to 4 h of normoxia, IH (5 or 10% $F_{I_{O_2}}$), or CH. \circ , Individual values; \bullet , means \pm SE. $*P < 0.05$ vs. the other groups. $\$P < 0.05$ vs. S 4h and IH10 4h groups, using a one-way ANOVA.

Table 3. Hemodynamic parameters after L-NAME or 5-HD infusion in groups exposed to 4 h of normoxia or hypoxia (10% inspired oxygen fraction)

	S 4h	IH10 4h	S + L-NAME	IH10 + L-NAME	S + 5-HD	IH10 + 5-HD
<i>n</i>	9	11	6	7	6	6
CF, %						
R15	62±3	70±6	50±4	52±6	64±9	66±4
R60	52±4	51±5	35±4	36±5	58±6	51±2
R120	41±3	44±4	30±2	28±4	48±6	41±3
HR, %						
R15	81±6	67±5	58±11	67±7	67±10	77±7
R60	89±6	76±4	68±9	85±7	83±3	88±5
R120	85±7	76±5	72±10	81±7	85±2	86±9
LVDP, %						
R15	83±13	90±10	116±11	74±9	50±7	41±5*
R60	74±13	97±10	97±11	62±6	61±6	54±5
R120	50±6	66±7	61±10	42±6	48±5	41±5
RPP, %						
R15	65±9	62±9	64±11	52±9	33±7	30±4
R60	63±9	64±9	62±8	53±7	50±5	46±4
R120	43±9	52±7	42±7	34±5	41±4	34±2
dP/dt _{max} , %						
R15	61±10	73±8	86±6	59±9	40±6	33±4*
R60	62±10	77±8	84±6	58±6	60±5	52±5
R120	43±5	63±6	55±9	42±6	48±4	39±5
dP/dt _{min} , %						
R15	70±11	77±10	95±8	66±11	38±6	32±4*
R60	58±8	77±9	82±8	56±6	51±6	44±4
R120	39±4	56±6	50±8	37±5	41±4	32±4

Values are means ± SE, expressed as percentage of values at 20 min of stabilization; *n*, no. of animals. L-NAME, *N*^ω-nitro-L-arginine; 5-HD, 5-hydroxydecanoic acid. **P* ≤ 0.05 vs. IH10 4h.

hypothesize that, with a short duration of hypoxia, biochemical triggers were not produced in sufficient amount to initiate PC and to allow myocardial protection. This is also seen with ischemic PC in which a minimum duration (25) and number of events (17) are required for cardioprotection to occur.

Role of the depth of IH. Interestingly, we observed that a 4-h IH with a minimal FI_{O_2} of 5% was able to render the heart more sensitive to ischemic injury, thus increasing infarct size, 24 h

later. As a result, LVDP and RPP were significantly lower in the IH5 4h group than in the other groups. Thus, according to the depth of the hypoxic phase, either limitation or aggravation of infarction can be reached. This is, to our knowledge, the first demonstration of a heart's increased sensitivity to infarction 24 h after an acute IH exposure. We have recently described that chronic exposure (8 h during daytime, for 35 days) to the same intermittent hypoxic stimulus (5% FI_{O_2}) resulted in increased sensitivity to myocardial infarction (13). The novel, important contribution of the present paper is the rapid onset of this event. Because patients with obstructive sleep apnea syndrome have higher rates of coronary heart disease (20), we could hypothesize that they are also more vulnerable than others to infarction and that this vulnerability is rapidly present in the natural history of the pathology.

Role of NO in the IH-induced cardioprotection. L-NAME, a NOS inhibitor, completely abrogated the IH-induced reduction in infarct size. The fact that NO could be a mediator of the IH response is in accordance with previous studies showing that protection conferred by other PC are also mediated by NO (for review, see Ref. 5). For example, heat stress-induced reduction in infarct size was abolished by L-NAME infusion before and during ischemia, in the isolated rat heart (14).

Role of mitochondrial K_{ATP} channel in the IH-induced cardioprotection. It has been shown that K_{ATP} channels are involved in mediating IH-induced cardioprotection in the rat using the sarcolemmal K_{ATP} channel blocker glibenclamide (30). This study used a high-altitude IH model. Another study demonstrated that both mitochondrial K_{ATP} and sarcolemmal K_{ATP} channels contribute to the cardioprotection in a chronic hypoxia model (3). Here, we showed an involvement of mitochondrial-type K_{ATP} in the cardioprotective effect conferred by

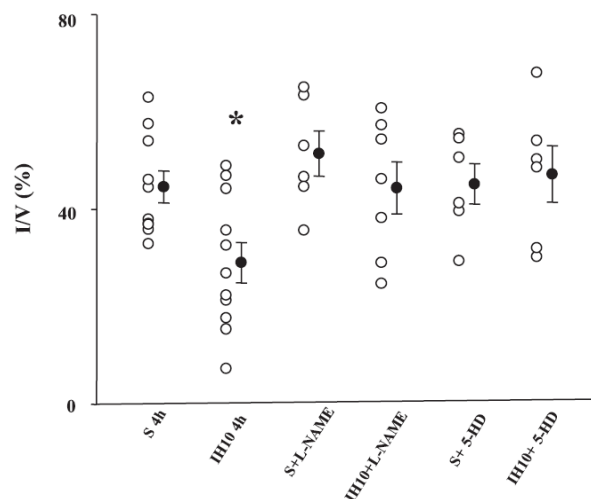


Fig. 6. Infarct size (I/V) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, in hearts infused with L-NAME and 5-HD. ○, Individual values; ●, means ± SE. **P* < 0.05 vs. the other groups, using a one-way ANOVA.

acute IH, as this effect was abolished by the selective mitochondrial K_{ATP} channel blocker 5-HD.

Limitation of our study. The major end point of our study being infarct size, we used the more reliable model, i.e., the retrograde perfusion one. Therefore, the infarct size limitation that we observed with 10% IH is only accompanied by a tendency to improve LVDP. In contrast, the increase in infarct size observed with 5% IH is accompanied by a significant decrease in LVDP.

The fact that infarct size was significantly modified without ventricular function variation is not surprising, as ventricular stunning should be similar even with different infarct sizes. This apparent discrepancy was previously observed (13).

In summary, this study showed that acute IH for 4 h with 10% O_2 induced a delayed PC against myocardial infarction in the rat. We have demonstrated the influence of the IH reoxygenation, the duration and the depth of IH exposure on the degree of cardioprotection. We showed here the implication of NOS and mitochondrial K_{ATP} channels in the cardioprotection afforded by acute IH.

GRANTS

This study was supported, in part, by a grant from the Conseil Scientifique of Association Grenobloise des Insuffisants Respiratoire à dom (France).

REFERENCES

- Arnaud C, Joyeux M, Garrel C, Godin-Ribuot D, Demenge P, and Ribuot C. Free-radical production triggered by hyperthermia contributes to heat stress-induced cardioprotection in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol* 135: 1776–1782, 2002.
- Asemu G, Papousek F, Ostadal B, and Kolar F. Adaptation to high altitude hypoxia protects the rat heart against ischemia-induced arrhythmias. Involvement of mitochondrial $K(ATP)$ channel. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1821–1831, 1999.
- Baker JE, Contney SJ, Gross GJ, and Bosnjak ZJ. $KATP$ channel activation in a rabbit model of chronic myocardial hypoxia. *J Mol Cell Cardiol* 29: 845–848, 1997.
- Baker JE, Curry BD, Olinger GN, and Gross GJ. Increased tolerance of the chronically hypoxic immature heart to ischemia. Contribution of the $KATP$ channel. *Circulation* 95: 1278–1285, 1997.
- Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1897–1918, 2001.
- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87: 972–983, 2000.
- Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, and Jadoon AK. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res* 81: 1094–1107, 1997.
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, and Semenza GL. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108: 79–85, 2003.
- Engelman DT, Chen CZ, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Maulik N, and Das DK. Improved 4- and 6-hour myocardial preservation by hypoxic preconditioning. *Circulation* 92: II417–II422, 1995.
- Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Kisin E, Kagan VE, Maulik N, and Das DK. Hypoxic preconditioning preserves antioxidant reserve in the working rat heart. *Cardiovasc Res* 29: 133–140, 1995.
- Grover GJ, Murray HN, Baird AJ, and Dzwonecnyk S. The $KATP$ blocker sodium 5-hydroxydecanoate does not abolish preconditioning in isolated rat hearts. *Eur J Pharmacol* 277: 271–274, 1995.
- Imagawa J, Yellon DM, and Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol* 126: 701–708, 1999.
- Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Launois SH, Bessard G, and Lévy P. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol* 98: 1691–1696, 2005.
- Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, and Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 55: 619–625, 2002.
- Karliner JS, Honbo N, Epstein CJ, Xian M, Lau YF, and Gray MO. Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1779–1786, 2000.
- Ladilov Y, Maxeiner H, Wolf C, Schafer C, Meuter K, and Piper HM. Role of protein phosphatases in hypoxic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1092–H1098, 2002.
- Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, and Imura O. Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning? *Circulation* 84: 2504–2512, 1991.
- Neckar J, Papousek F, Novakova O, Ost'adal B, and Kolar F. Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol* 97: 161–167, 2002.
- Neckar J, Szarszoi O, Koten L, Papousek F, Ost'adal B, Grover GJ, and Kolar F. Effects of mitochondrial $K(ATP)$ modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res* 55: 567–575, 2002.
- Peker Y, Hedner J, Kraiczki H, and Loth S. Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 81–86, 2000.
- Prabhakar NR. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 90: 1986–1994, 2001.
- Sasaki H, Fukuda S, Otani H, Zhu L, Yamaura G, Engelman RM, Das DK, and Maulik N. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 34: 335–348, 2002.
- Sun JZ, Tang XL, Park SW, Qiu Y, Turrens JF, and Bolli R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J Clin Invest* 97: 562–576, 1996.
- Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, and Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 98: 441–449, 1998.
- Takehisa S, Vaage J, and Valen G. Preconditioning the globally ischaemic, isolated rat heart: the impact of the preconditioning model on post-ischaemic systolic and diastolic function. *Scand J Clin Lab Invest* 57: 637–646, 1997.
- Xi L, Tekin D, Gursoy E, Salloum F, Lévassieur JE, and Kukreja RC. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H5–H12, 2002.
- Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, and Hori M. A “second window of protection” occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1181–1189, 1998.
- Yoshida K, Mizukami Y, and Kitakaze M. Nitric oxide mediates protein kinase C isoform translocation in rat heart during postischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1453: 230–238, 1999.
- Zhong N, Zhang Y, Zhu HF, Wang JC, Fang QZ, and Zhou ZN. Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacol Sin* 23: 305–310, 2002.
- Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Ding HL, and Zhou ZN. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Life Sci* 73: 1275–1287, 2003.

4.1.2 Résultats additionnels

Lors de la mise en place du modèle de PC hypoxique, nous avons également testé un autre stimulus et une autre forme d'ischémie. Ces résultats, n'ayant pas donné lieu à publication, font l'objet de cette présentation séparée.

L'HI de deux cycles par minute

Comme nous avons montré que l'hypoxie suivie de la réoxygénation est un facteur nécessaire pour induire une cardioprotection, nous avons voulu tester si une réoxygénation plus fréquente pouvait avoir le même effet, voire accentuer l'effet cardioprotecteur. Pour cela, nous avons soumis les rats à deux cycles par minute d'HI, ceux-ci étaient composés de 12 secondes d'hypoxie (5 ou 10% d'O₂) suivies de 18 secondes de normoxie. Ce stress induit une diminution de la taille de l'infarctus dans le groupe HI 10% par rapport au groupe contrôle (I/V : $17,2 \pm 1,7\%$ vs $32,1 \pm 6,3\%$) mais cette différence n'est pas significative. De plus, cette étude a montré qu'un stimulus de deux cycles par minutes à 5% d'O₂ n'aggrave plus la taille de l'infarctus par rapport au contrôle mais tend à la diminuer ($23,1 \pm 4,8\%$ vs $32,1 \pm 6,3\%$). Comme il n'y avait pas de différence significative entre les groupes du point de vue de la taille de l'infarctus, nous n'avons pas gardé ce stimulus comme modèle de PC hypoxique. Dans notre modèle d'HI à 2 cycles par minute, les animaux sont exposés en tout à 24 secondes d'hypoxie contre 40 sec pour un cycle d'une minute. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le temps total passé en hypoxie est insuffisant pour permettre le développement de la cardioprotection (à 10% d'O₂) ou de la cardiosensibilisation (à 5% d'O₂).

L'ischémie régionale

Nous avons également attaché de l'importance à la nature de l'ischémie. Afin de savoir si celle-ci modifie la réponse au stress hypoxique 24 heures après une HI de 4 heures, trois groupes ont été étudiés : un groupe normoxique (21% d'O₂) et deux groupes hypoxiques (5 ou 10 % d'O₂). Les cœurs ont été soumis à 20 minutes de stabilisation, 30 minutes d'ischémie régionale (ligature de l'artère coronaire gauche) puis 120 minutes de reperfusion. Aucune différence de taille de la zone à risque n'a été mise en évidence entre les trois groupes, ce qui traduit la reproductibilité de l'ischémie réalisée. La taille de l'infarctus par rapport à la zone à risque (I/R) ne diffère pas entre les groupes (I/R : groupe HI5, $23,3 \pm 3,6\%$; groupe HI10, $33,3 \pm 3,4\%$ et groupe N, $32,6 \pm 6,3$), ni les paramètres hémodynamiques. Ces résultats suggèrent que l'HI ne protège pas contre une ischémie régionale. Selon la nature de l'ischémie, le cœur ne répond pas de la même façon au PC hypoxique, ceci ne semble pas contradictoire avec les précédentes études puisque l'effet du PC hypoxique a été démontré suite à une ischémie globale [27-29].

4.2 Voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection induite par l'HI aiguë

4.2.1 Etude 2 : La cardioprotection retardée induite par l'hypoxie intermittente est médiée par la PKC et déclenchée par la p38 MAP kinase et Erk1/2.

“Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2”

Pauline C. Béguin, Elise Belaidi, Diane Godin-Ribuot, Patrick Lévy, Christophe Ribuot.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2006 Déc 21, Epub ahead of print.

Résumé

Une hypoxie intermittente (HI) aiguë, comme des épisodes répétés d'ischémie [8], est capable de protéger le cœur contre les dommages causés par une séquence d'I/R. Les voies de signalisation impliquées dans le PC ischémique et dans le PC pharmacologique sont décrites largement dans la littérature, ce qui n'est pas le cas pour la forme de PC retardé que nous avons mise en évidence. La but de cette étude est donc de voir si les voies de signalisation à l'origine de l'effet protecteur du PC hypoxique sont les mêmes que celles impliquées dans les autres formes de PC retardé.

La première implication de la PKC dans la genèse d'un PC retardé a été mise en évidence par l'équipe de Yellon [48]. Depuis, de nombreuses études ont été menées sur ce sujet et il est incontestable que la PKC joue un rôle important dans les mécanismes de PC retardé. Il a été montré, en particulier, que le recrutement et la translocation de la PKC sont des éléments indispensables au développement d'une cardioprotection retardée [50], les isoformes impliquées restant toutefois à déterminer en fonction du PC étudié.

L'activation de la PI3K est cruciale pour la survie des cellules cardiaques [101], elle agit sur plusieurs effecteurs dont la protéine kinase B, communément nommée Akt. Cette dernière induit la survie cellulaire et a un effet anti-apoptotique [102]. En réponse aux lésions d'I/R, la voie de la PI3K-Akt protège le myocarde [103, 104]. Il a été montré que cette voie de signalisation est impliquée dans le déclenchement du PC myocardique retardé. En effet, l'administration de wortmannin, un inhibiteur de la PI3K, avant le PC ischémique empêche la réduction de la taille de l'infarctus chez le lapin [55].

Les protéines kinases MAP (mitogen-activated protein kinases, MAPK) sont impliquées dans un grand nombre de réponses cellulaires, notamment l'adaptation au stress [105]. Dans le cœur, on retrouve en particulier les kinases 1 et 2 extracellulaires (Erk1/2), la p38 MAP kinase et la protéine kinase activée par le stress (SAPK)/c-Jun aminé terminal (JNK) [56]. Il a été montré dans différentes études que la p38 MAPK et Erk1/2 sont impliquées dans le phénomène de PC retardé [15, 61].

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'implication de la PKC, de la PI3K, de la p38 MAP kinase et d'Erk1/2 dans la cardioprotection retardée induite par l'HI aiguë.

L'inhibition de la PKC, avant la séquence d'ischémie-reperfusion, par la chélérythrine, a eu pour conséquences de prévenir la diminution de la taille de l'infarctus et l'amélioration des paramètres hémodynamiques induits par l'HI. Ce résultat suggère donc un rôle de la PKC comme médiateur du PC induit par l'HI aiguë.

De plus, l'administration de wortmannin (inhibiteur de la PI3K) ou de chélérythrine 10 minutes avant le stress ne modifie pas les effets cardioprotecteurs induits par le PC hypoxique. Ces résultats démontrent que ni la PKC, ni la PI3K ne semblent être impliquées dans notre modèle de PC retardé.

Enfin, l'administration du SB203580 (inhibiteur de la p38 MAP kinase) et du PD98059 (inhibiteur de Erk1/2) abolit de façon significative l'effet protecteur du PC hypoxique sur la taille de l'infarctus. Cette cardioprotection est associée à une augmentation significative de l'activation (observée par la phosphorylation des protéines) des protéines p38 MAP kinase et Erk1/2. Ces derniers résultats suggèrent que la p38 MAP kinase et Erk1/2 semblent être des déclencheurs de la cardioprotection induite par le PC hypoxique.

En résumé, cette étude suggère que la PI3K n'est pas impliquée dans le PC retardé induit par l'HI. En revanche, la p38 MAP kinase et Erk1/2 semblent jouer un rôle d'initiateur et la PKC un rôle de médiateur de la réponse protectrice induite le PC hypoxique.

Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2.

Pauline C. Béguin, Elise Belaidi, Diane Godin-Ribuot, Patrick Lévy, Christophe Ribuot.

Abstract

Objective. We previously reported that acute intermittent hypoxia (IH) confers delayed cardioprotection against a prolonged ischemic insult in the rat, via the involvement of nitric oxide synthase and K_{ATP} channels. In the present study, we investigated the role of protein kinase C (PKC), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), stress activated p38 MAP kinase (MAPK) and extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) using selective inhibitors of these pathways. *Methods.* Adult male rats were exposed to 1-min cycles of IH (10% O_2 , 40 sec) / normoxia (21% O_2 , 20 sec) during 4 hrs or to normoxic cycles. 24 hrs later, isolated hearts were perfused in Langendorff mode and subjected to a 30-min global ischemia followed by 120 min of reperfusion. *Results.* Compared to normoxic conditions, IH significantly reduced infarct size ($22.2 \pm 2.4\%$ vs $33.8 \pm 2.6\%$, $p < 0.05$), improved coronary flow and decreased the contracture at reperfusion. When administered before sustained ischemia, chelerythrine (a PKC inhibitor) abolished both the IH-induced reduction in infarct size ($36.1 \pm 4.9\%$) and improvement in hemodynamic parameters. In contrast, chelerythrine administration 10 min before IH, did not modify the delayed cardioprotective response. Similarly, wortmannin (a PI3K inhibitor) administration 10 min before IH was unable to block the cardioprotective effects. However, administration of SB203580 (a p38 MAPK inhibitor) and PD98059 (an Erk1/2 inhibitor), 30 min before IH abolished its delayed infarct-sparing effect ($32.2 \pm 3.4\%$ and $33.9 \pm 2.9\%$ respectively). In addition, 24 hrs after IH, a significant increase in p38 MAPK and Erk1/2 phosphorylation was observed by Western blot. *Conclusion.* These results suggest that the delayed preconditioning induced by intermittent hypoxia does not involve the PI3K signalling pathway and that is mediated by PKC and triggered by p38 MAPK and Erk1/2.

Key words: intermittent hypoxia, hypoxia/anoxia, infarction, preconditioning, protein kinase C, MAP kinase.

Abbreviations

CF, coronary flow

Chel, chelerythrine

Dmso, dimethyl sulfoxide

HR, heart rate

I, infarct size

IH, intermittent hypoxia

KH, Krebs-Henseleit buffer

LVDP, left ventricular developed pressure

LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure

MAPK, mitogen-activated protein kinase

MEK, mitogen-activated protein kinase kinase

N, normoxia

PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase

PKC, protein kinase C

RPP, rate pressure product

V, ventricle size

WOT, wortmannin

Introduction

Intermittent hypoxia (IH) is one of the major components of obstructive sleep apnea syndrome [1] [2]. It has been extensively demonstrated both in animals [3] and humans [4] that IH is a determinant of cardiovascular morbidity. Surprisingly, a decline in mortality rates with age has been observed in OSA patients [5], which suggests a possible cardiovascular protection by IH [6]. There are several described differences between sustained hypoxia (SH) and IH. Notably, it has been observed a differential gene activation under IH or SH [7]. We have thus studied the acute effects of a model mimicking the OSA consequences as previously described [8].

Hypoxic preconditioning (PC), like ischemic PC [9] can provide delayed protection against ischemia-reperfusion injury [10, 11]. Notably, we have recently reported that IH for 4 hrs with 10% O₂ induces cardioprotection illustrated by a reduction of infarct size in isolated rat heart [8].

The cellular pathways and mechanisms involved in delayed ischemic PC are well documented. In particular, the first demonstration of a role for PKC in delayed PC, was from Yamashita and colleagues who demonstrated that staurosporine, a PKC inhibitor, could prevent *in vitro* the acquisition of this phenomenon in hypoxic preconditioned rat cardiomyocytes [12]. Subsequently, it was observed in the rabbit, that the delayed protection following ischemic PC is abolished *in vivo* by chelerythrine (Chel), another PKC inhibitor [13]. The first aim of the present study was to assess whether the IH-induced reduction in infarct size is mediated and/or triggered by PKC (i.e.: chelerythrine treatment before sustained ischemia or prior to hypoxic PC).

Recent studies have revealed that phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) pathway is involved in delayed myocardial PC as a triggering actor. Notably, wortmannin (WOT), a PI3K inhibitor, administration before ischemic PC prevents the reduction in infarct size in the rabbit [14]. Moreover, in a mice model, WOT administration before pharmacological PC abolished its antiapoptotic effect [15]. Therefore, the second aim of this study was to test whether PI3K is involved in triggering the myocardial protection induced by IH.

The mitogen-activated protein kinases (MAPK) mediate various cellular responses including proliferation, differentiation and adaptation to stress [16]. Two major MAP kinase families have been studied in the triggering phase of PC: the p38 MAPK and the extracellular signal-

regulated kinase (Erk1/2). The p38 MAPK signalling pathways has been shown to be implicated in both delayed ischemic [17] and pharmacological [18, 19] PC. Meanwhile, the Erk1/2 cascade has been involved in delayed hypoxic [20] and pharmacological PC [21]. Taken together, these findings led us to assess whether p38 MAPK and/or Erk1/2 activation participate to the IH-induced delayed cardioprotection.

Methods

The investigation conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Experiments were conducted on adult male Wistar rats (weight range 330-380 g) from Elevage Janvier (France) housed in controlled conditions and provided with standard rat chow.

Intermittent hypoxia protocol

Rats were exposed to intermittent hypoxia (IH) as previously described [8]. Briefly, rats were placed in Plexiglas chambers (length 28 cm, diameter 10 cm, volume 2.2 l). A timed solenoid valve was used to distribute nitrogen and air to each chamber. IH chambers were flushed with an air-nitrogen mixture for 40 sec to achieve hypoxia (10% O₂) followed by 20 sec of compressed air to restore normoxia (21% O₂). This 1-min cycle was repeated for 4 hrs. In parallel, compressed air at the same flow rate was distributed to sham chambers in order to submit sham animals to similar noise and airflow disturbances. The level of O₂ in the chambers was controlled throughout the hypoxia protocol using a gas analyzer (model ML206, AD Instruments).

Isolated rat heart preparation

Twenty-four hours after IH, the rats were anesthetized with 60 mg/kg i.p. sodium pentobarbital and treated with heparin (500 UI/kg, i.v.). Hearts were rapidly excised and briefly placed in cold (4°C) Krebs-Henseleit (KH) buffer before being mounted on the Langendorff apparatus via the aorta. The hearts were then retrogradely perfused at constant pressure (75 mmHg), with KH buffer containing in mM: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.2 and glucose 11.0. The perfusion medium was continuously gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ and maintained at 37 °C and pH 7.4 as previously described [8]. A water-filled latex balloon (Hugo Sachs, n°4), connected to a pressure transducer, was inserted into the left ventricular cavity *via* the left atrium for pressure recording. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) was adjusted between 5-10 mmHg. Myocardial temperature was measured by a thermoprobe inserted into the left atrium and was maintained constant at 37°C. After 20 min of stabilization, no-flow global ischemia was induced by stopping the perfusion for 30 min. The hearts were kept at constant humidity

and temperature (37°C) throughout ischemia and were thereafter reperfused for 120 min. Coronary flow (CF), expressed in ml/min/g, was measured periodically during the ischemia-reperfusion procedure, by collecting the effluent. Heart rate (HR), LVEDP, left ventricular developed pressure (LVDP = difference between left ventricular systolic pressure and LVEDP) and dP/dt max (maximal rate of left ventricular pressure rise) were recorded continuously (PC Lab 4S, AD Instruments).

Treatment groups

Twenty-four hours prior to global ischemia-reperfusion, all rats were submitted to either normoxia (N, 21% O₂) or intermittent hypoxia (IH, 10% O₂) during 4 hrs, and randomised into one of 16 groups (Figure 1):

Groups N (n=8) and IH (n=8) were only submitted to normoxic or IH exposure.

Groups N Chel1 (n=7) and IH Chel1 (n=7) were infused with chelerythrine 5 µM [23], 10 min before ischemia.

Groups N dms0 10 (n=7), IH dms0 10 (n=9), N WOT (n=9), IH WOT (n=7), N Chel2 (n=9) and IH Chel2 (n=8), were injected (i.p.) with dms0 1%, wortmannin 15 µg/kg [24] and chelerythrine 5 mg/kg [25] respectively, 10 min prior to N or IH.

Groups N dms0 30 (n=7), IH dms0 30 (n=8), N SB (n=8), IH SB (n=8), N PD (n=8) and IH PD (n=8), were injected (i.p.) with dms0 1%, SB203580 1 mg/kg [21] and PD98059 0,5 mg/kg [18] respectively, 30 min prior to N or IH.

Infarct size

At the end of the ischemia-reperfusion protocol, the atria were removed and the hearts were frozen at -20°C for 10 min. They were then cut into 2-mm transverse sections from apex to base (6-7 slices/heart). Once thawed, the slices were incubated at 37°C with 1% triphenyltetrazolium chloride in phosphate buffer (pH 7.4) for 10 min, fixed in 10% formaldehyde solution and photographed. Areas of infarcted tissue were measured using a computerized planimetric technique (Image Tool for Windows) and expressed as a percentage of total ventricular area (I/V).

Western blotting

To determine whether hypoxic PC was associated with an activation of Akt, p38 and Erk1/2 MAP kinases, hearts from additional animals (n=4 in each group) submitted to normoxia or

IH were harvested 24 hrs later as described above. Hearts were homogenized in lysis buffer and centrifugated at 13 000 rpm for 20 minutes to remove nuclei and debris. The supernatant was collected and protein concentration was determined by the Pierce assay (Perbio Science France, Bezons, France). Proteins were loaded at 50-70 µg/lane. Phosphorylated states of Akt (phospho Akt; Ser 473), p38 MAPK (phospho p38; Thr180/Tyr182) and Erk1/2 (phospho-Erk; Thr202/Tyr204) as well as total levels of Akt, p38 MAPK, Erk1/2 and GAPDH were analysed by 10% SDS/PAGE with antibodies from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) (except for GAPDH from Santa Cruz Technology, Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). Equal loading was confirmed with GAPDH, and levels of phosphorylated proteins were normalised to total protein levels assessed in the same samples and under the same conditions on separate membrane. Relative densitometry was computerized (Image J software).

Exclusion criteria

Only hearts with $CF \leq 20$ ml/min/g and $LVDP > 70$ mmHg at the end of the stabilization period were included in this study.

Chemicals

Chelerythrine, wortmannin and PD98059 were from Calbiochem (VWR International, Fontenay sous Bois, France), dmsO from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and SB203580 was synthesised by Dr A. Boumendjel (DPM, UMR 5063 UJF/CNRS, Université Grenoble I, France).

Statistical analysis

Hemodynamic and infarct size data are presented as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.). Infarct size values and hemodynamic data were compared using two-way analyses of variance (ANOVA), with exposure and treatment corresponding to each factor. *Post-hoc* multiple comparisons were performed using Bonferroni tests. For blot analysis groups were compared using t-tests. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

1- Intermittent hypoxia-induced myocardial preconditioning.

IH induced a delayed myocardial protection as shown by a smaller infarct-to-ventricle ratio ($22.2 \pm 2.4\%$ in group IH vs $33.8 \pm 2.6\%$ in group N, $p < 0.05$) (Figure 2a) and an improvement in functional recovery at reperfusion illustrated by higher CF and smaller LVEDP values (Figure 2b and Table 1). The stabilization values of hemodynamic parameters in N and IH groups are similar.

2- PKC is a mediator of IH preconditioning.

Infusion of chelerythrine 10 min prior to ischemia resulted in abolition of IH-induced cardioprotection with no difference in infarct size ($36.1 \pm 4.9\%$ in group IH Chel1 vs $39.4 \pm 5.5\%$ in group N Chel1) (Figure 2a) nor in hemodynamic parameters (Figure 2b and Table 1) between hypoxic and normoxic groups. The stabilization values of hemodynamic parameters in N, IH, N Chel1 and IH Chel1 groups are similar.

3- PI3 kinase or PKC activation does not trigger IH preconditioning.

IH did not modify basal myocardial levels of Akt (Figure 3a bottom panel) compared to normoxic controls. The level of Akt phosphorylation in normoxic and hypoxic groups was similar. Wortmannin injection 10 min prior to N or IH induced a 1.5 fold decrease in Akt phosphorylation in both groups 24 h after stress (Figure 3a). The phosphorylation state of Akt was examined immediately following hypoxic PC and it was observed that wortmannin reduced the phosphorylation in N and IH groups (data not shown). Wortmannin pretreatment did not modify the delayed protective effects on infarct size ($19.0 \pm 2.2\%$ in group IH WOT vs $38.6 \pm 4.3\%$ in group N WOT, $p < 0.05$) (Figure 3b) and functional recovery upon reperfusion (Table 2).

Likewise, chelerythrine pretreatment did not prevent the cardioprotective effects on infarct size ($23.0 \pm 1.8\%$ in group IH Chel2 vs $35.0 \pm 3.4\%$ in group N Chel2, $p < 0.05$) (Figure 3b) and functional recovery (Table 3). Vehicle (dms0 1%) injection 10 min prior to N or IH had no effect *per se* (Figure 3b and Table 2). The stabilization values of hemodynamic parameters in N dms0 10, IH dms0 10, N Chel2, IH Chel2, N WOT and IH WOT groups are similar.

4- p38 MAP kinase and Erk1/2 activation are triggers of IH-preconditioning.

SB203580 as well as PD98059 injection 30 min prior to IH abolished the IH-induced cardioprotective effects. Indeed, there was no difference in infarct size ($32.2 \pm 3.4\%$ in group IH SB vs $33.5 \pm 2.5\%$ in group N SB and $33.9 \pm 2.9\%$ in group IH PD vs $26.8 \pm 3.9\%$ in

group N PD) (Figure 4) and in coronary flow upon reperfusion (Table 3) between hypoxic and normoxic animals. Vehicle (dms0 1%) administration 30 min prior to N or IH had no effect *per se* (Figure 4 and Table 3). The stabilization values of hemodynamic parameters in N dms0 30, IH dms0 30, N SB, IH SB, N PD and IH PD groups are similar.

5- Phosphorylation of myocardial p38 MAPK and Erk1/2 after IH.

IH did not modify basal myocardial levels of p38 MAPK and Erk1/2 (Figures 5a and 6a, respectively) compared to normoxic control.

Twenty-four hours after IH, a 1.7 fold increase in p38 MAPK phosphorylation (Figure 5b) and a 1.5 fold increase in Erk1/2 phosphorylation (Figure 6b) were observed in the myocardium.

Discussion

This study provides the first demonstration that IH-induced delayed protection against myocardial infarction is triggered by p38 MAPK and Erk1/2 but not by PI3K and PKC. PKC, however, seems to play a role as a mediator of hypoxic PC. This is based on the observation that: 1) chelerythrine infusion before ischemia blocked the IH-induced cardioprotection, 2) wortmannin or chelerythrine injection prior to IH did not modify the cardioprotective response, 3) the MAP kinase inhibitor SB203580 and the MEK inhibitor PD98059, injected prior to IH, blocked the IH-induced cardioprotection and 4) a significant phosphorylation of both p38 MAPK and Erk1/2 was observed in the myocardium 24 hrs after IH.

In this study, we investigated the role of PKC in triggering and mediating IH-induced PC. We showed that IH-induced cardioprotection was abolished when chelerythrine was infused before ischemia. This is in accordance with other studies which have shown, using chelerythrine, a role for PKC in mediating delayed ischemic [13] and pharmacological [26] PC. However, the implication of other kinases can not be excluded since chelerythrine has been reported to affect some of them [27]. Furthermore, activation of PKC after ischemic PC is isoform selective. Notably, the epsilon isoform appears to be responsible for the development of delayed cardioprotection in the rabbit [28]. Thus assessment of the PKC isoform relevant to protection induced by IH should be of interest.

In a previous study [8], we suggested involvement of the ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel, as mediator of protection, in delayed hypoxic PC. Protein kinase-catalyzed phosphorylation is an important mechanism by which the activity of ion channels, including the K_{ATP} channel, can be controlled [29]. There is evidence suggesting the importance of PKC in activating K_{ATP} channels during the protective mechanism of delayed pharmacological PC [30]. Thus an interaction between PKC and K_{ATP} in the IH-induced cardioprotection could be possible and this could be investigated in measuring mitochondrial matrix redox potential (an index of $mitoK_{ATP}$ channel activity) with and without a PKC inhibitor. In our previous study [8] we also demonstrated a role for NO synthase (NOS) in mediating IH-induced PC since a non specific inhibitor of NOS, L-NAME, abolished the delayed cardioprotection. We can suggest in the study presented here that PKC could play a role on NOS expression. Indeed, it is well-documented in ischemic or pharmacological PC, that activation of PKC-epsilon triggers a signalling cascade that leads to the binding of the transcription factor NF- κ B to the

inducible NOS (iNOS) promoter. This results in synthesis of new iNOS proteins, which leads to a preconditioned phenotype [31].

On the other hand, we showed that chelerythrine injection prior to IH did not modify IH-induced delayed cardioprotection. This is, to our knowledge, the first demonstration that the triggering phase of delayed PC is independent of PKC activation. However, this is consistent with previous studies. In fact, on studies focussing on early ischemic PC it was observed that PKC inhibition did not alter the infarct size reduction achieved by PC in the anesthetized open-chest dog [22]. Moreover, the work of Yang et al supports the idea that in rabbit heart, the trigger phase of early PC does not require kinase activity, while the mediation phase is dependent on kinase phosphorylation [32].

The PI3K signalling pathway has been shown to confer protection against ischemia-reperfusion injury *via* the activation of Akt [33]. Kis and colleagues have shown that WOT blocked delayed ischemic PC and prevented Akt phosphorylation *in vivo* in the rabbit [14]. In contrast, we observed that WOT, even if preventing Akt phosphorylation, did not block the IH-induced PC. This discrepancy should be due to species differences, to the PC stimulus or to the WOT dosage used. Therefore, we can suggest that Akt phosphorylation is not involved in IH PC in the rat. This is also, to our knowledge, the first demonstration that the triggering phase of delayed PC is independent of PI3K activation. However, this is consistent with previous studies focussing on early pharmacological PC in which the adenosine-induced PC was shown to be insensitive to wortmannin [34, 35].

Several studies have reported the implication of p38 MAPK in delayed pharmacological PC [17, 18]. In accordance, we observed that SB203580, a p38 MAPK inhibitor, abolished the cardioprotection afforded by IH.

There is also evidence that hypoxia can activate p38 MAPK in several tissues including the heart [36, 37]. Notably, p38 MAP kinase phosphorylation was reported 24 hrs after delayed pharmacological PC [38]. This is also confirmed in our study since we observed a myocardial activation of p38 MAPK 24 hrs after IH.

Since SB203580 has been reported to also inhibit the stress activated protein kinase, SAPK/JNK [39], we cannot rule out a role of this kinase in the PC conferred by IH. Moreover, controversy exists as to the beneficial-detrimental role of p38 MAPK in cardioprotection [40]. Indeed persistent activation of p38 MAPK during ischemia has been

shown to be deleterious for cells [41, 42]. This dual role may be explained by differential function of p38 subfamily members. Thus, it should be further investigated which p38 isoform is involved in the IH-induced delayed PC. Finally, the causal relationship between p38 MAPK phosphorylation and IH-induced cardioprotection should be assessed by studying the effect of SB203580 on p38 MAPK phosphorylation.

In contrast to the numerous reports involving p38 MAPK in delayed PC, there are few studies on Erk1/2, another member of the MAPK family. Two studies showed that PD98059 abolished delayed pharmacological PC [18, 21]. Our study is the first to show that PD98059 blocked the IH-induced PC. Additionally, we observe an increase in Erk1/2 phosphorylation 24 hrs after IH. This result is in accordance with a study showing an increase in Erk1/2 phosphorylation 18 hrs after hypoxia [35]. Like for p38 MAPK, the causal relationship between Erk1/2 phosphorylation and cardioprotection needs further investigation. Another limitation of our study is the use of inhibitors that are not fully specific (chelerythrine, SB203580), even if we used them at a concentration demonstrated in literature to have an effect in the rat.

One potential limitation of this study is that only one time point was chosen to examine the phosphorylation level of several protein kinases induced by IH. It would be important to examine the time course of phosphorylation/dephosphorylation of these protein kinases in the setting of IH PC and this is the subject of a future investigation.

In summary, this study shows that PKC, as a mediator, and p38 MAPK and Erk1/2, as triggers, participate to the IH-induced delayed PC. In a putative linear pathway linking these various actors of hypoxic PC, we would thus expect PKC to be downstream from MAP kinases because treatment with the p38 MAPK and Erk1/2 inhibitors abolished cardioprotection when administered before IH and treatment with chelerythrine only abolished cardioprotection when given before the prolonged ischemic period.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the Région Rhône-Alpes and the Association Grenobloise des Insuffisants Respiratoires. P.C.B. and E.B. are recipients of doctoral fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

We would like to thank Bruno Chapuis for the conception of the computer program controlling the hypoxic and normoxic cycles and Dr Ahcene Boumendjel for SB203580 synthesis.

References

- [1] Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem*. 1996 Nov 29; 271(48): 30835-9.
- [2] Neubauer JA. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol*. 2001 Apr; 90(4): 1593-9.
- [3] Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, et al. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol*. 2005 May; 98(5): 1691-6.
- [4] Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest*. 2005 Nov; 128(5): 3407-12.
- [5] Lavie P, Lavie L, Herer P. All-cause mortality in males with sleep apnoea syndrome: declining mortality rates with age. *Eur Respir J*. 2005 Mar; 25(3): 514-20.
- [6] Lavie L, Lavie P. Ischemic preconditioning as a possible explanation for the age decline relative mortality in sleep apnea. *Med Hypotheses*. 2006; 66(6): 1069-73.
- [7] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005 Oct 25; 112(17): 2660-7.
- [8] Beguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Levy P, Ribuot C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol*. 2005 Sep; 99(3): 1064-9.
- [9] 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.
- [10] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003 Jul 8; 108(1): 79-85.
- [11] Xi L, Tekin D, Gursoy E, Salloum F, Levasseur JE, Kukreja RC. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283(1): H5-12.
- [12] Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, Kuzuya T, Hori M, Taniguchi N, et al. Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning. *J Clin Invest*. 1994 Dec; 94(6): 2193-9.

- [13] Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol.* 1995 May; 115(2): 222-4.
- [14] Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Sep; 35(9): 1063-71.
- [15] Wang Y, Ahmad N, Kudo M, Ashraf M. Contribution of Akt and endothelial nitric oxide synthase to diazoxide-induced late preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Sep; 287(3): H1125-31.
- [16] Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res.* 1998 Aug 24; 83(4): 345-52.
- [17] Carroll R, Yellon DM. Delayed cardioprotection in a human cardiomyocyte-derived cell line: the role of adenosine, p38MAP kinase and mitochondrial KATP. *Basic Res Cardiol.* 2000 Jun; 95(3): 243-9.
- [18] Lasley RD, Keith BJ, Kristo G, Yoshimura Y, Mentzer RM, Jr. Delayed adenosine A1 receptor preconditioning in rat myocardium is MAPK dependent but iNOS independent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug; 289(2): H785-91.
- [19] Zhao TC, Hines DS, Kukreja RC. Adenosine-induced late preconditioning in mouse hearts: role of p38 MAP kinase and mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Mar; 280(3): H1278-85.
- [20] Gong KZ, Zhang ZG, Li AH, Huang YF, Bu P, Dong F, et al. ROS-mediated ERK activation in delayed protection from anoxic preconditioning in neonatal rat cardiomyocytes. *Chin Med J (Engl).* 2004 Mar; 117(3): 395-400.
- [21] Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2001 Apr; 96(2): 136-42.
- [22] Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, Kloner RA. Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? *Circulation.* 1995 Sep 15; 92(6): 1546-57.
- [23] 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.

- [24] Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Auchampach JA, Gross GJ. Extending the cardioprotective window using a novel delta-opioid agonist fentanyl isothiocyanate via the PI3-kinase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jun; 288(6): H2744-9.
- [25] Arnaud C, Joyeux-Faure M, Bottari S, Godin-Ribuot D, Ribuot C. New insight into the signalling pathways of heat stress-induced myocardial preconditioning: protein kinase Cepsilon translocation and heat shock protein 27 phosphorylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004 Mar; 31(3): 129-33.
- [26] Baxter GF, Mocanu MM, Yellon DM. Attenuation of myocardial ischaemic injury 24 h after diacylglycerol treatment in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jul; 29(7): 1967-75.
- [27] Yu R, Mandlekar S, Tan TH, Kong AN. Activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31; 275(13): 9612-9.
- [28] Qiu Y, Ping P, Tang XL, Manchikalapudi S, Rizvi A, Zhang J, et al. Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that epsilon is the isoform involved. *J Clin Invest*. 1998 May 15; 101(10): 2182-98.
- [29] Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1; 97(16): 9058-63.
- [30] Nayeem MA, Mustafa SJ. Mechanisms of delayed preconditioning with A1 adenosine receptor activation in porcine coronary smooth muscle cells. *Pol J Pharmacol*. 2002 Sep-Oct; 54(5): 443-53.
- [31] Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Nov; 33(11): 1897-918.
- [32] Yang XM, Sato H, Downey JM, Cohen MV. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Mar; 29(3): 991-9.
- [33] Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Tsai BM, Morrell ED, Meldrum DR. Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials. *J Am Coll Surg*. 2006 May; 202(5): 797-812.
- [34] Qin Q, Downey JM, Cohen MV. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Feb; 284(2): H727-34.

- [35] Germack R, Dickenson JM. Adenosine triggers preconditioning through MEK/ERK1/2 signalling pathway during hypoxia/reoxygenation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Sep; 39(3): 429-42.
- [36] Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Jun; 282(6): L1324-9.
- [37] Zheng M, Reynolds C, Jo SH, Wersto R, Han Q, Xiao RP. Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury. *Faseb J.* 2005 Jan; 19(1): 109-11.
- [38] Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism. *Circ Res.* 2000 May 12; 86(9): 989-97.
- [39] Clerk A, Sugden PH. The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett.* 1998 Apr 10; 426(1): 93-6.
- [40] Ping P, Murphy E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ Res.* 2000 May 12; 86(9): 921-2.
- [41] Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *Faseb J.* 2000 Nov; 14(14): 2237-46.
- [42] Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, et al. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res.* 2003 Aug 8; 93(3): 254-61.

Figure legends

Figure 1. Experimental protocol. Rats were submitted to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) during 4 hrs. Subsequently, all animals were allowed to recover for 24 hrs. Then, after a 20 min stabilization period, a 30-min no-flow global ischemia followed by a 120-min reperfusion was performed *in vitro*. Chelerythrine was infused 10 min before ischemia (Chel1). In other groups, wortmannin (WOT), chelerythrine (Chel2) and their vehicle (dms0 10) were injected intraperitoneally 10 min prior to normoxic or hypoxic stress. Finally, SB203580 (SB), PD98059 (PD) and their vehicle (dms0 30) were injected 30 min prior to stress.

Figure 2. a- Infarct size expressed as a percentage of ventricles (I/V) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, in groups exposed to normoxia (N) or intermittent hypoxia with 10% O₂ (IH) without and with chelerythrine infusion 10 min before ischemia (groups N Chel1 and IH Chel1). * $p < 0.05$, N.S: non significant using a two-way ANOVA. **b-** Effect of N, IH and chelerythrine infusion (Chel1) on coronary flow. After 20 min of stabilization, hearts were subjected to 30 min of no-flow global ischemia followed by 120 min of reperfusion. Coronary flow was collected at 5, 15, 30, 60, 90, 120 min of reperfusion. * $p < 0.05$ using a two-way ANOVA.

Figure 3. a- Representative Western blots demonstrating basal myocardial levels of Akt and phosphorylated Akt 24 hrs after stress in rats submitted to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) and injected with dms0 (dms0 10) or wortmannin (WOT). Density expressed in arbitrary units (n = 4 per group). * $p < 0.05$ using a two-way ANOVA. **b-** Infarct size expressed as a percentage of ventricles (I/V) assessed after a no-flow global ischemia (30 min)-reperfusion (120 min) sequence, in hearts from rats injected with dms0 (dms0 10), wortmannin (WOT) or chelerythrine (Chel2) 10 min prior to N or IH. * $p < 0.05$ using a two-way ANOVA.

Figure 4. Infarct size expressed as a percentage of ventricles (I/V) in hearts from rats injected with dms0 (dms0 30), SB203580 (SB) or PD98059 (PD) 30 min prior to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). * $p < 0.05$ using a two-way ANOVA.

Figure 5. a- Representative Western blots of basal myocardial levels of p38 MAP kinase (top panel) and phosphorylated p38 MAP kinase (bottom panel) 24 hrs after normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). **b-** Ratio of phosphorylated p38 MAP kinase over total p38 MAP kinase content in N and IH groups (n=4 per group). GAPDH demonstrates equal protein loading in experimental groups. Data are expressed as a percentage of normoxic control values. * $p < 0.05$ using a t-test.

Figure 6. a- Representative Western blots demonstrating basal myocardial levels of Erk1/2 and phosphorylated Erk1/2 24 hrs after normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH). **b-** Ratio of phosphorylated Erk1/2 over total Erk1/2 content in N and IH groups (n=4 per group). GAPDH demonstrates equal protein loading in experimental groups. Data are expressed as a percentage of normoxic control values. * $p < 0.05$ using a t-test.

Table 1. Hemodynamic parameters recorded in hearts from rats submitted 24 hrs earlier to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH) without and following chelerythrine infusion (Chel1) 10 min before ischemia.

		N	IH	N Chel1	IH Chel1
<i>CF</i>					
(ml/min/g)	<i>R 15</i>	6.0±0.2	8.5±0.9	4.4±0.3	4.6±0.4
	<i>R 60</i>	5.0±0.4	7.5±0.9	3.7±0.2	3.8±0.4
	<i>R 120</i>	4.3±0.3	6.1±0.8	2.8±0.3	2.8±0.3
		⏟ *			
<i>LVEDP</i>					
(mmHg)	<i>R 15</i>	71.9±5.4	63.5±7.1	65.3±4.7	71.9±5.4
	<i>R 60</i>	54.7±5.9	45.7±6.2	38.9±3.8	54.7±5.9
	<i>R 120</i>	47.0±5.4	41.7±5.2	34.3±3.7	47.0±5.4
		⏟ *			
<i>RPP</i>					
(mmHg/min)	<i>R 15</i>	11434±1911	10331±2198	3189±1336	2249±749
	<i>R 60</i>	13528±1737	17136±1757	8153±1842	11426±1996
	<i>R 120</i>	10803±1521	13489±926	6041±1181	7019±916

CF - coronary flow, LVEDP - left ventricular end diastolic pressure, RPP - rate pressure product. R15, R 60 and R 120 after 15 min, 60 min and 120 min of reperfusion, respectively. Data are expressed as mean ± s.e.m. * $p \leq 0,05$.

Table 2. Hemodynamic parameters recorded in hearts from rats pretreated 24 hrs earlier with dms0, chelerythrine or wortmannin 10 min prior to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH).

		N dms0 10	IH dms0 10	N WOT	IH WOT	N Chel2	IH Chel2
CF							
(ml/min/g)	<i>R 15</i>	5.7±0.5	6.3±0.3	6.3±0.3	8.0±0.6	8.2±0.6	8.0±0.7
	<i>R 60</i>	5.0±0.6	5.5±0.3	4.8±0.2	6.9±0.5	6.6±0.5	6.8±0.6
	<i>R 120</i>	3.7±0.4	4.4±0.1	3.7±0.2	5.2±0.4	5.0±0.5	5.0±0.5
		* ⏟		* ⏟			
LVEDP							
(mmHg)	<i>R 15</i>	64.6±4.4	62.6±2.5	76.2±2.4	64.1±3.0	49.2±2.7	48.4±5.7
	<i>R 60</i>	47.0±4.9	43.0±3.0	66.5±7.4	51.3±2.3	36.7±2.3	35.9±4.5
	<i>R 120</i>	45.1±3.9	40.0±2.9	55.4±5.4	44.5±1.5	34.7±1.5	34.0±3.4
				* ⏟			
RPP							
(mmHg/min)	<i>R 15</i>	6787±1210	9987±1830	8916±2038	8452±2356	14604±1987	15684±3187
	<i>R 60</i>	14645±2463	15295±937	8243±1671	13337±1457	17679±1610	16723±2362
	<i>R 120</i>	10701±1261	11883±961	6009±1046	11604±1626	13055±1325	12253±1732
				* ⏟			

CF - coronary flow, LVEDP - left ventricular end diastolic pressure, RPP - rate pressure product. R15, R 60 and R 120 after 15 min, 60 min and 120 min of reperfusion, respectively.

Data are expressed as mean ± s.e.m. * $p \leq 0,05$.

Table 3. Hemodynamic parameters recorded in hearts from rats pretreated 24 hrs earlier with dms0 (dms0 30), SB203580 (SB) or PD98059 (PD) 30 min prior to normoxia (N) or intermittent hypoxia (IH).

		N dms0 30	IH dms0 30	N SB	IH SB	N PD	IH PD
CF							
(ml/min/g)	<i>R 15</i>	3.8±0.3	4.9±0.2	5.6±0.3	5.7±0.4	6.2±0.6	6.8±0.5
	<i>R 60</i>	3.2±0.2	4.2±0.2	4.6±0.3	5.3±0.5	5.1±0.5	5.3±0.4
	<i>R 120</i>	2.5±0.1	3.4±0.3	3.8±0.3	4.1±0.3	4.1±0.6	4.5±0.3
LVEDP							
		⏟ *					
(mmHg)	<i>R 15</i>	73.1±6.2	74.1±6.0	89.4±3.8	79.1±4.9	93.1±3.4	89.2±3.0
	<i>R 60</i>	49.8±6.2	54.1±5.4	72.3±3.1	62.3±4.1	74.6±4.0	69.4±2.7
	<i>R 120</i>	40.2±6.3	46.0±5.6	63.1±3.5	55.4±4.4	67.3±3.9	61.6±2.7
RPP							
(mmHg/min)	<i>R 15</i>	2577±672	3307±866	6723±978	6127±1980	9756±1317	9954±1830
	<i>R 60</i>	7128±1657	8458±1076	9137±1019	12354±1374	12802±1590	12394±1348
	<i>R 120</i>	5803±1222	8791±1161	6785±675	8888±975	9738±1203	9770±1084

CF - coronary flow, LVEDP - left ventricular end diastolic pressure, RPP - rate pressure product. R15, R 60 and R 120 after 15 min, 60 min and 120 min of reperfusion, respectively. Data are expressed as mean ± s.e.m. * $p \leq 0,05$.

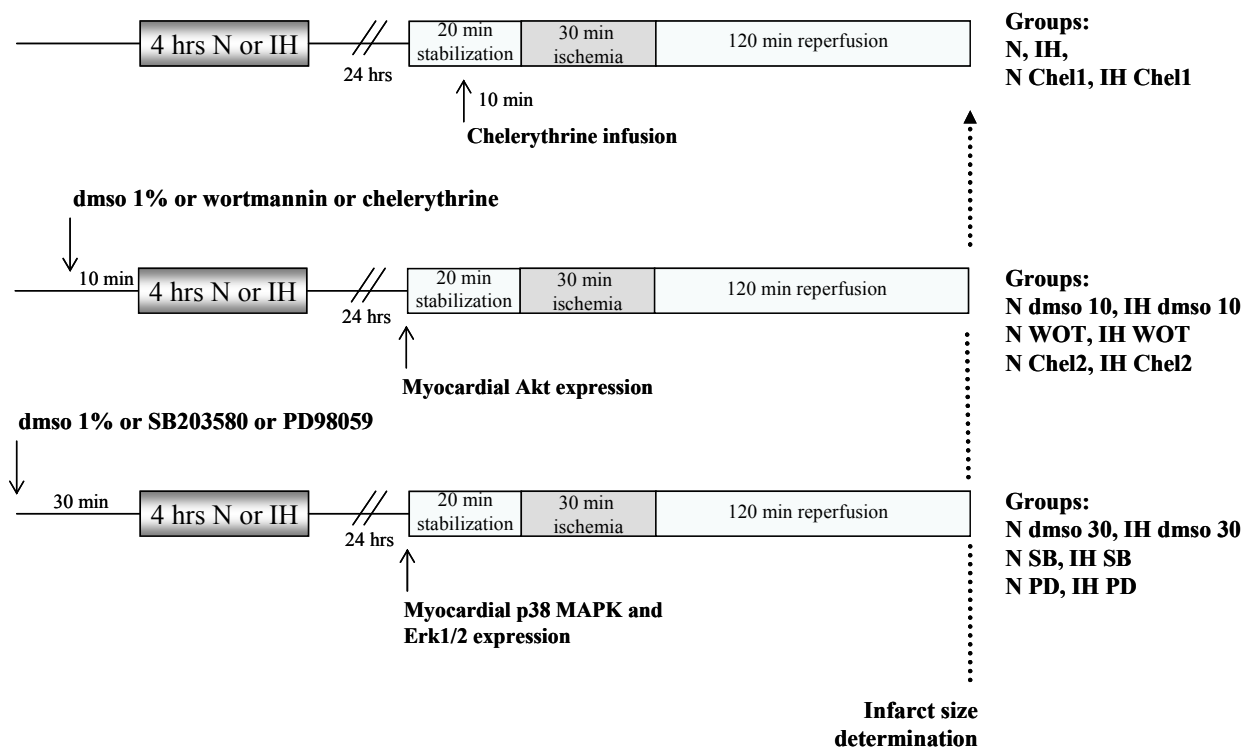


Figure 1.

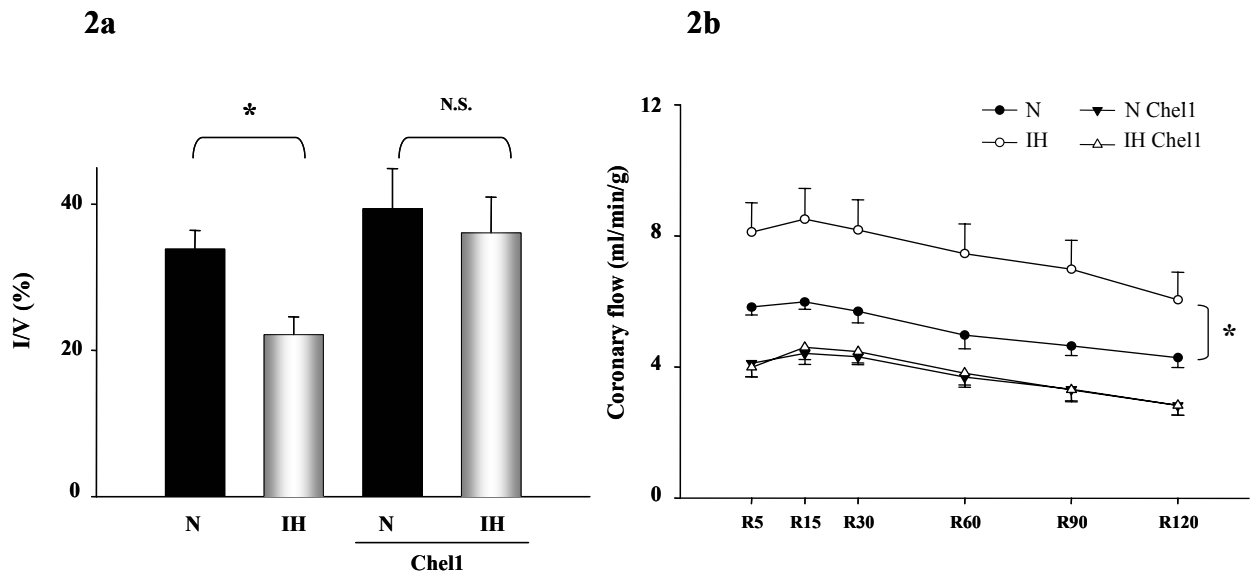


Figure 2.

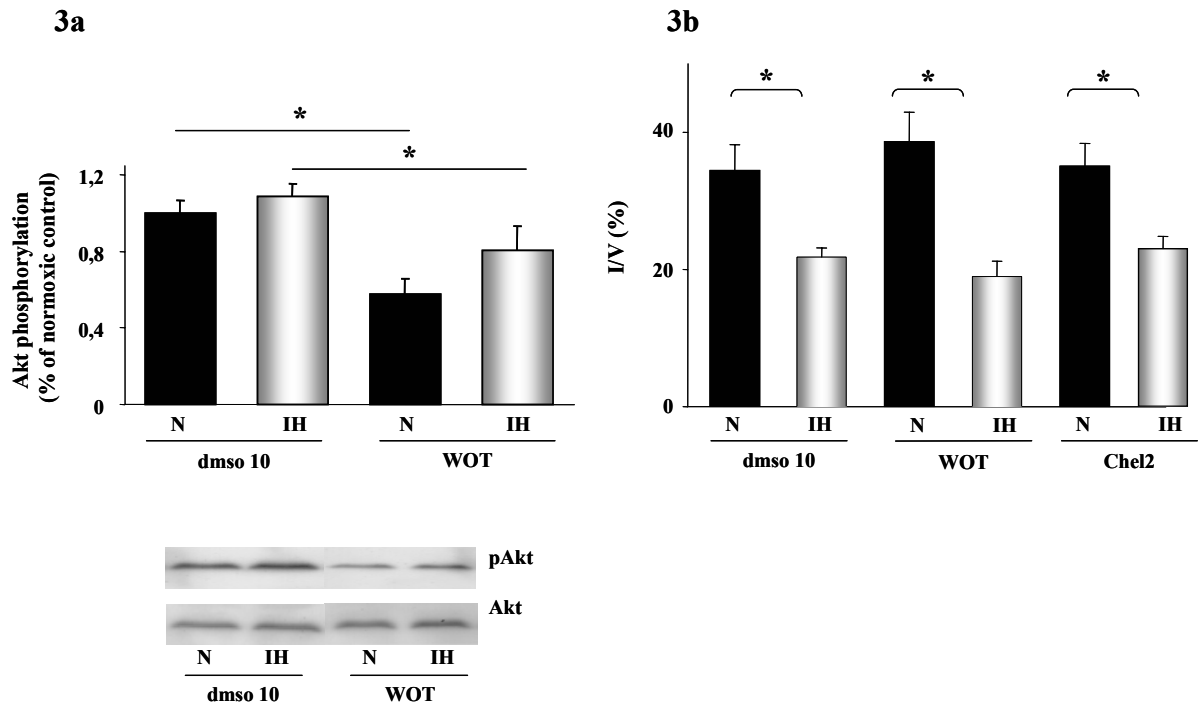


Figure 3.

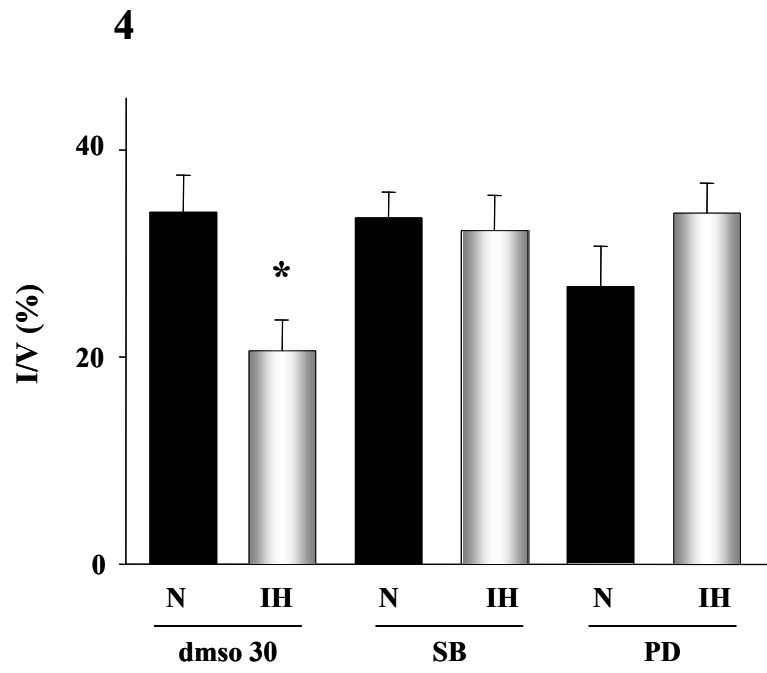
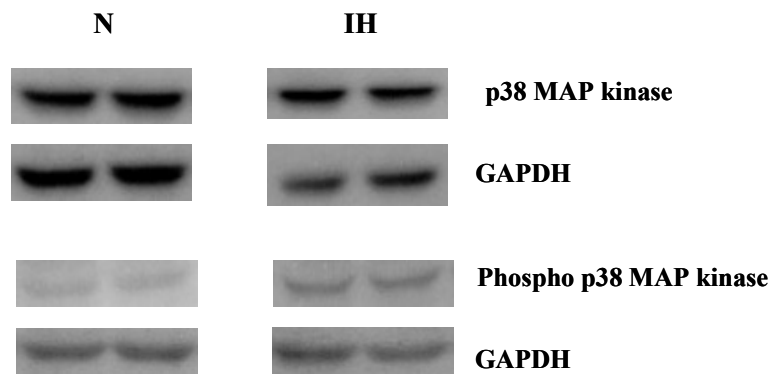


Figure 4.

5a



5b

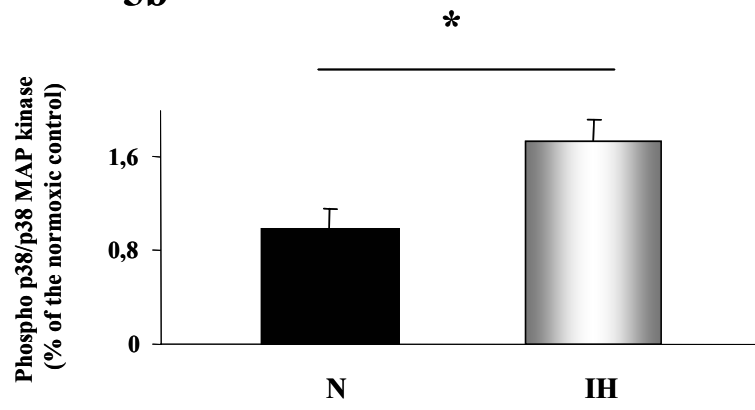


Figure 5.

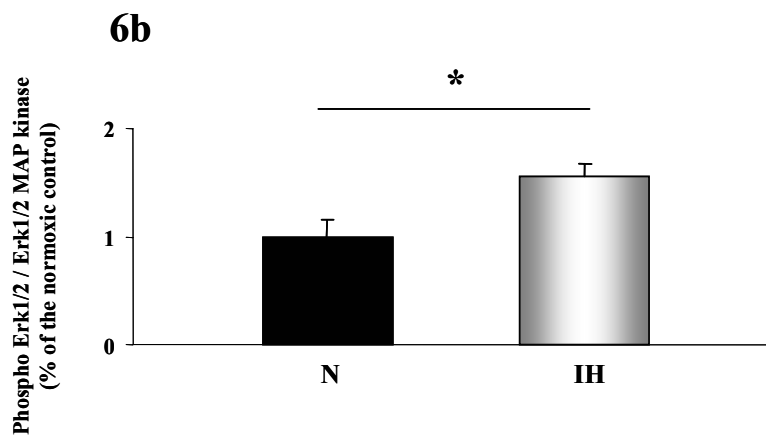
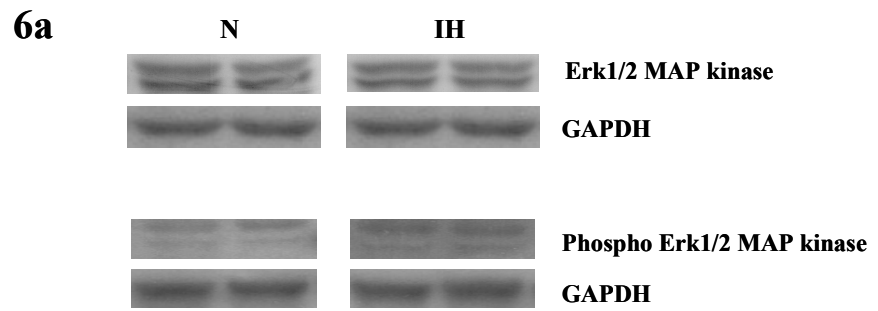


Figure 6.

4.2.2 Résultats additionnels

Lors de l'étude 1 que nous avons décrite précédemment, nous nous sommes intéressés aux médiateurs potentiels de l'effet cardioprotecteur induit par le PC hypoxique. Pour ce faire, nous avons utilisé différents inhibiteurs administrés préalablement à la séquence d'I/R afin d'étudier le rôle des canaux K_{ATP} et du NO. Enfin, dans un travail additionnel nous avons étudié l'implication potentiel des canaux KCa dans la réponse protectrice induite par l'HI.

Les canaux K_{ATP} mitochondriaux

Dans l'étude 1, nous avons recherché l'implication éventuelle des canaux mito K_{ATP} comme médiateurs du PC hypoxique. Des cœurs de rats, préalablement exposés au stress HI, ont été perfusés 10 minutes avant la séquence d'I/R, par le 5-hydroxydecanoate, un inhibiteur spécifique des canaux mito K_{ATP} . En présence de cet inhibiteur, la protection myocardique induite par le PC hypoxique vis-à-vis de la taille de l'infarctus a été significativement abolie.

Le NO

Dans l'étude 1, nous avons également étudié le rôle des NOS dans notre modèle de PC. En effet, en perfusant du L-NAME, un inhibiteur non spécifique des NOS, nous avons aboli l'effet protecteur du PC hypoxique sur la taille de l'infarctus sans modifier les paramètres hémodynamiques. Les NOS semblent donc jouer un rôle de médiateur du PC hypoxique.

Dans un travail récent, nous avons mis en évidence que l'isoforme de la NOS impliquée dans le PC hypoxique était la forme inductible, la iNOS. Nous avons exposé des rats à 4 heures de normoxie ou d'HI. Vingt-quatre heures après, les cœurs ont été isolés, puis perfusés 10 minutes avant la séquence d'I/R par une solution de krebs contenant de l'aminoguanidine (100 μ M), un inhibiteur de la iNOS. La perfusion d'aminoguanidine abolit à la fois la

réduction de la taille de l'infarctus (Figure 7a) et l'amélioration du débit coronaire à la reperfusion (Figure 7b) induites par le PC hypoxique.

Nous avons, suite à ce résultat, mesuré l'expression myocardique de la iNOS 24 heures après le stress dans le cœur de rat. Aucune bande spécifique de la iNOS n'a pu être révélée sur les membranes de Western blot pour tous les échantillons tissulaires analysés (N et HI). Les différentes dilutions de l'anticorps anti-iNOS testées (1 µg/mL et 5 µg/mL), ainsi que le dépôt de plus grandes quantités de protéines (jusqu'à 100 µg de protéine extraite du cœur de rat), en parallèle avec l'utilisation d'un témoin positif (iNOS recombinante), n'ont pas permis la détection de la iNOS. Ce résultat a été observé par d'autres équipes qui ont eu aussi de la difficulté à détecter la présence de la iNOS par cette technique. Il est possible que la quantité de iNOS présente dans le myocarde soit inférieure au seuil de détection de la technique du Western blot. Une autre méthode, qui permettrait de détecter la présence de iNOS, même en faible quantité, est la mesure d'activité de cette enzyme.

De plus, les différences d'expression des autres isoformes de cette enzyme, nNOS et eNOS, ont été recherchées par Western blot dans les groupes N et HI. L'HI ne semble pas induire d'activation de ces deux isoformes en comparaison à la normoxie.

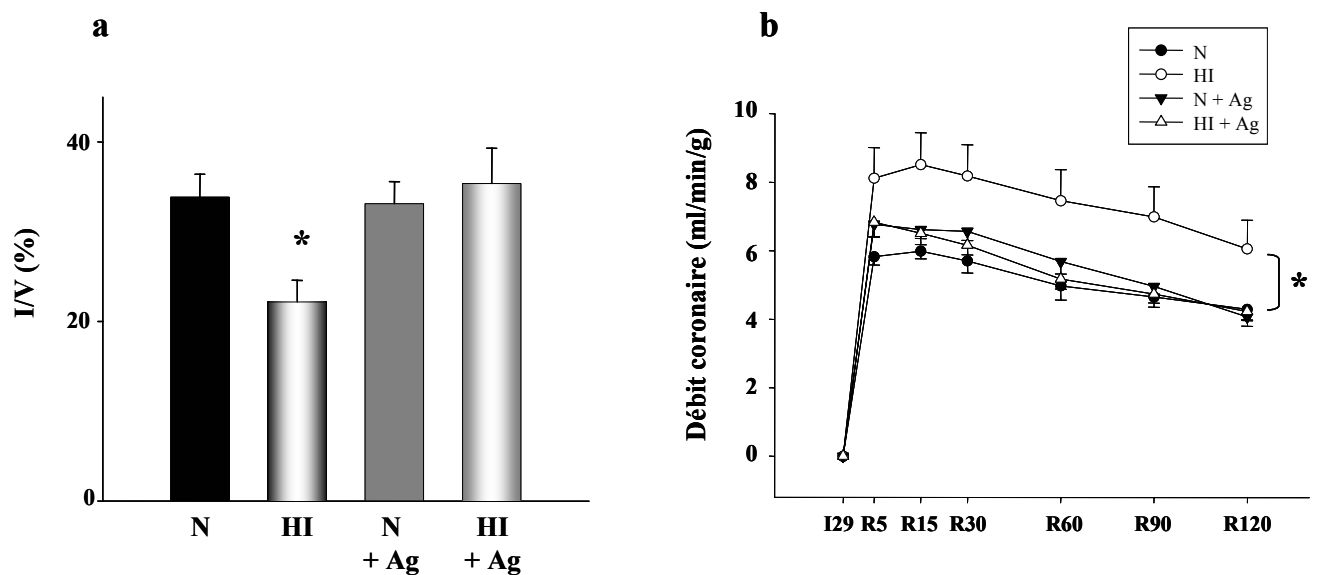


Figure 7. Effets de la perfusion d'aminoguanidine chez des rats exposés à la normoxie ou à l'hypoxie intermittente.

a- Taille de l'infarctus exprimée en pourcentage des ventricules (I/V) après une séquence d'ischémie (30 min)-reperfusion (120 min), dans les groupes exposés à la normoxie (N) ou à l'hypoxie intermittente (HI) avec 10% d'O₂, sans ou avec perfusion d'aminoguanidine 10 min avant l'ischémie (groupes N+Ag et HI+Ag)

b- Effet de la normoxie, de l'HI et de la perfusion d'aminoguanidine sur le débit coronaire (DC). Après 20 min de stabilisation, les coeurs sont soumis à 30 min d'ischémie globale suivie de 2 h de reperfusion. Après l'ischémie (I), le DC est collecté à 5, 15, 30, 60, 90 et 120 min de reperfusion.

* $p < 0.05$, en utilisant une ANOVA deux voies.

Le canal K_{Ca}

L'implication des canaux mitoK_{ATP} dans la cardioprotection est largement décrite dans la littérature. Cependant un autre canal potassique, dépendant du calcium, le canal K_{Ca} a été mis en évidence dans des myocytes au niveau de la membrane interne de la mitochondrie

[106]. L'ouverture de ce canal semble également induire une protection. Pour étudier si ce canal exerce un rôle de médiateur dans la cardioprotection induite par l'HI, nous avons perfusé les cœurs, avant l'I/R, avec un inhibiteur de ce canal, la paxilline. La paxilline ne modifie pas la réduction de la taille de l'infarctus chez le groupe HI, cependant elle diminue la taille de l'infarctus dans le groupe N (Figure 8). Nous ne pouvons donc pas conclure à une action du canal K_{Ca} dans le PC hypoxique puisque la paxilline a un effet par elle-même. La paxilline, en inhibant l'ouverture du canal K_{Ca}, semble avoir le même effet protecteur que le PC hypoxique. La diminution de l'ouverture du canal K_{Ca} par la paxilline induirait une inhibition du courant potassique qui entraînerait une prolongation de la repolarisation à l'origine d'une diminution de l'excitabilité du cœur. On peut émettre l'hypothèse que le blocage de ce canal constitue un moyen pour le cœur de se préserver des lésions dues à la séquence d'ischémie-reperfusion.

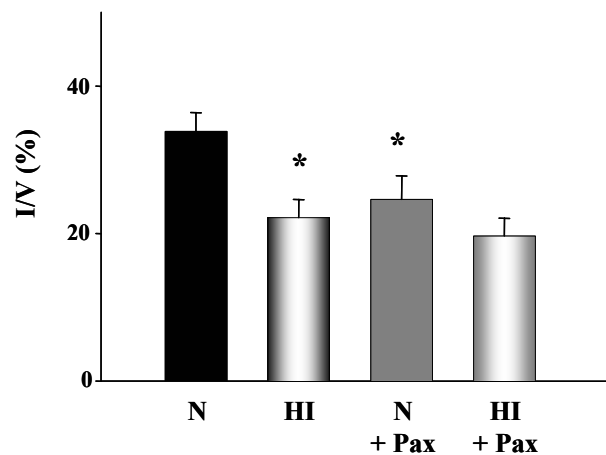


Figure 8. Effet de la perfusion de paxilline sur la taille de l'infarctus chez des rats exposés à la normoxie ou à l'hypoxie intermittente.

Taille de l'infarctus exprimée en pourcentage des ventricules (I/V) après une séquence d'ischémie (30 min)-reperfusion (120 min), dans les groupes exposés à la normoxie (N) ou à l'hypoxie intermittente (HI) avec 10% d'O₂, sans ou avec perfusion de paxilline 10 min avant l'ischémie (groupes N+Pax et HI+Pax). * $p < 0.05$, en utilisant une ANOVA deux voies.

5 Discussion et perspectives

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, l'hypoxie intermittente est capable d'induire un préconditionnement myocardique retardé contre les lésions d'ischémie-reperfusion. L'objectif de notre travail était de comprendre les mécanismes impliqués dans cette cardioprotection, du déclenchement de la réponse par différents signaux aux effecteurs finaux.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle de PC hypoxique en testant différentes durées et intensités d'hypoxie intermittente. Puis nous avons recherché l'implication des MAP kinases, de la PKC et de la PI3K dans ce modèle de PC. Enfin, nous avons étudié l'implication de la PKC, des canaux K_{ATP} et de la iNOS comme médiateurs du PC hypoxique.

5.1 L'hypoxie intermittente aiguë, un modèle de préconditionnement

La première étude décrite dans ce manuscrit démontre que l'exposition des rats à une HI de 4 heures à 10% d'O₂ induit une protection retardée contre l'infarctus du myocarde dans un modèle de cœur isolé perfusé. Nous avons par la suite montré une amélioration de la récupération fonctionnelle après l'ischémie chez les animaux exposés à ce stress. En effet, durant la reperfusion, nous avons observé une augmentation significative du débit coronaire et une diminution de la contracture (illustrée par une diminution de la pression télédiastolique) chez les animaux du groupe HI (étude 2). L'augmentation du débit coronaire permet une meilleure reperfusion myocardique et peut expliquer à la fois la diminution de la contracture et la réduction de la taille de l'infarctus. Nous avons également montré qu'une hypoxie continue de même durée et de même intensité n'a aucun effet. Ce résultat obtenu après une hypoxie continue, de 4 heures à 10% d'O₂, est en désaccord avec d'autres études qui suggèrent que celle-ci serait capable de préconditionner le myocarde en induisant une angiogenèse myocardique chez le rat [107] ou en réduisant la taille de l'infarctus chez la souris [29]. Concernant l'étude menée par l'équipe de Sasaki [107], nous pouvons faire l'hypothèse

que la différence est liée au modèle utilisé pour créer l'infarctus : occlusion permanente de l'artère. Nous avons par ailleurs observé une différence de la réponse du myocarde à l'HI lorsque nous avons réalisé une ischémie régionale suivie de reperfusion plutôt qu'une ischémie globale. L'autre étude portait sur la souris, une différence inter-espèces vis-à-vis de la susceptibilité myocardique à l'infarctus peut être envisagée ici. La FC et la fréquence respiratoire différentes entre souris et rat peut expliquer que ces deux espèces répondent différemment à l'HI.

Dans notre étude, l'intermittence de l'hypoxie, et donc la phase de réoxygénation, est essentielle pour protéger le myocarde de rat contre l'infarctus. Un mécanisme possible expliquant cette cardioprotection retardée pourrait être la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) pendant l'alternance hypoxie-réoxygénation. Bien que potentiellement délétères lorsque présents en grande quantité, les RLO semblent également avoir un effet protecteur au niveau cardiaque [108]. Une hypoxie de 2 heures suivie de 24 heures de réoxygénation génère des RLO à l'origine d'une protection des cardiomyocytes de rats [109]. De plus, plusieurs études ont montré que les RLO sont impliqués dans divers formes de PC retardé induit par l'ischémie [16, 39, 41], l'hyperthermie [42] ou les anesthésiques volatiles [110].

La deuxième partie de cette étude a mis en évidence l'importance de la durée de l'HI dans le développement de la cardioprotection. Nous avons observé qu'une durée d'HI de 30 minutes n'est pas suffisante pour réduire la taille de l'infarctus. Nous pouvons avancer comme hypothèse que suite à une courte durée d'HI, la production d'agents inducteurs est trop faible pour initier le PC et permettre la protection myocardique. Cette hypothèse se rapproche du concept développé par l'équipe de Jim Downey [111]. En effet, on peut penser que l'HI à 4 heures active des voies de signalisation à l'origine de la protection et qu'avec une HI de 30 minutes on se trouve en dessous du seuil d'activation de ces voies et donc qu'on ne puisse pas obtenir de cardioprotection.

Le PC ischémique nécessite une durée minimum [112] et un certain nombre d'épisodes d'ischémie [113] afin d'induire une cardioprotection.

La troisième partie de cette étude suggère que l'intensité de l'hypoxie est importante pour induire l'effet protecteur du PC hypoxique. Une exposition de 4 heures à une HI à 5% d'O₂ sensibilise le cœur de rat à l'ischémie-reperfusion puisque les animaux hypoxiques présentent une aggravation de la taille de l'infarctus accompagnée d'une diminution de la récupération fonctionnelle par rapport aux animaux normoxiques. Il semble donc que selon l'intensité de l'hypoxie on atteigne soit une limitation soit une aggravation de l'infarctus. C'est, à notre connaissance, la première démonstration d'une augmentation de la sensibilité du cœur à l'infarctus 24 heures après une exposition aiguë à l'hypoxie. Nous avons observé dans une précédente étude qu'une exposition chronique à une HI à 5% d'O₂ (8 heures par jour pendant 35 jours) induit également une sensibilisation à l'infarctus du cœur isolé de rat [114]. Notre étude suggère que la sensibilisation à l'infarctus, observée en chronique, est un événement précoce.

Les résultats de cette première étude nous ont permis de caractériser un nouveau type de PC retardé induit par une hypoxie intermittente de 4 heures à 10% d'O₂. Nous avons montré que plusieurs paramètres influencent cette cardioprotection : l'intermittence hypoxie-réoxygénation, la durée et l'intensité de l'exposition à l'HI.

5.2 Les déclencheurs du PC hypoxique

Les MAP kinases

Les cellules répondent aux modifications environnementales par l'activation de voies de transduction intracellulaire qui conduisent à une modification de l'expression génique. Les voies des MAP kinases impliquent des protéines kinases, elles-mêmes activées par phosphorylation, et qui aboutissent, après une cascade de phosphorylations-déphosphorylations, à l'activation de molécules-clés, comme les facteurs de transcription.

La p38 MAP kinase, qui appartient à la famille des sérines/thréonine kinases [115], a été impliquée de nombreuses fois dans le PC retardé. En effet, l'administration de SB203580, un inhibiteur de la p38 MAP kinase, avant le PC retardé induit par l'adénosine ou l'hyperthermie, bloque la réduction de la taille de l'infarctus chez le rat [96, 116]. Il a été montré que l'hypoxie peut phosphoryler et donc activer la p38 MAP kinase dans de nombreux tissus dont le coeur [117, 118]. Il a également été mis en évidence une phosphorylation de la p 38 MAPK, 24 heures après un PC pharmacologique [119]. En accord avec ces études, nous avons observé que le SB203580 abolit la protection myocardique conférée par l'HI. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de la phosphorylation de la p38 MAP kinase 24 heures après le PC hypoxique. Cependant, il a été montré que le SB203580 est capable d'inhiber d'autres protéines kinases activées par le stress [120]. Nous ne pouvons donc pas exclure un rôle de ces kinases dans notre modèle, et ce d'autant plus qu'il a été rapporté que la p38 MAP kinase peut avoir un rôle délétère pour la survie cellulaire selon l'isoforme impliquée [121, 122]. Il est donc nécessaire de caractériser l'isoforme impliquée dans notre modèle de PC hypoxique.

Contrairement aux nombreuses études rapportant un rôle de la p38 MAP kinase dans le PC retardé, peu d'études ont démontré un rôle de Erk dans ce phénomène. L'utilisation d'un inhibiteur de MEK-1 (à l'origine de l'activation de Erk1/2) bloque l'effet protecteur du PC à l'adénosine [96] et aux opioïdes [61]. D'autre part, un PC ischémique [123] ou pharmacologique [124] augmente la phosphorylation, et donc l'activation, de Erk1/2. Par une approche cellulaire, il a été montré que l'hypoxie phosphoryle Erk, provoquant ainsi une protection des cardiomyocytes néonataux de rat [125, 126]. Dans la deuxième étude, nous avons observé pour la première fois que l'inhibition de MEK-1 abolit la réduction de la taille de l'infarctus induite par le PC hypoxique. De plus, nous avons observé une augmentation durable de la phosphorylation de Erk1/2, puisque notable encore 24 heures après l'HI. Ce résultat est en accord avec une étude qui montre une phosphorylation de Erk1/2, après 4h d'hypoxie et 18 heures de réoxygénation [127].

La PI3 kinase

La voie de signalisation de la PI3K confère une protection contre les lésions provoquées par l'I/R [128] via l'activation (phosphorylation) de la protéine kinase Akt. Dans un modèle cellulaire, il a été montré qu'une heure d'hypoxie est capable de conduire à l'activation de la PI3 kinase et d'Akt [129]. La voie de la PI3K semble jouer un rôle majeur dans l'initiation du PC retardé. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la PI3K, la wortmannin, *in vivo* chez le lapin, réduit la phosphorylation d'Akt et bloque totalement la protection retardée du PC ischémique [55]. De plus, l'administration de ce même inhibiteur abolit l'effet antiapoptotique du PC pharmacologique chez la souris [130]. Bien que nous ayons observé une réduction de la phosphorylation d'Akt suite à l'administration de la wortmannin dans les groupes normoxique et hypoxique, il n'y a pas de modification des effets protecteurs du PC hypoxique. La différence entre nos résultats et ceux de Kis et collaborateurs [55] peut être due à une différence inter-espèces, au stimulus préconditionnant ou à la dose de wortmannin administrée. A notre connaissance, notre résultat est le premier à démontrer que la phase de déclenchement du PC retardé est indépendante de l'activation de la PI3K. En effet, seules des études concernant le PC précoce ont montré que les mécanismes protecteurs dus au PC étaient indépendants de la PI3K [127, 131].

La protection myocardique induite par le PC hypoxique semble donc impliquer les MAP kinases, en particulier la p38 MAP kinase et Erk1/2. Par contre, la PI3K ne semble jouer aucun rôle dans notre modèle.

5.3 Les médiateurs du PC hypoxique

La PKC

La deuxième étude que nous avons décrite dans ce manuscrit nous a permis de mettre en évidence l'implication de la PKC dans la cardioprotection induite par l'HI. La chélérythrine est un inhibiteur de la PKC. Lorsqu'on l'administre avant la séquence d'I/R, la chélérythrine

bloque totalement les effets protecteurs du PC hypoxique. Ces résultats, obtenus sur cœur isolé de rat, sont concordants avec ceux de la littérature [91, 93, 132]. En effet, il a été montré que l'administration de chélérythrine bloque les effets protecteurs du PC retardé ischémique [48] et pharmacologique [49]. Il ne faut pas exclure dans notre étude une action de la chélérythrine sur d'autres kinases, il a en effet été montré que cet inhibiteur agit sur certaines MAP kinases [133]. Cependant, nous avons perfusé une dose de chélérythrine à une concentration connue pour avoir un effet inhibiteur de la PKC chez le rat [95].

L'activation de la PKC après le PC est isoforme dépendante. Il a notamment été observé, dans diverses formes de PC retardé, que la PKC ϵ était responsable du développement de la cardioprotection [51, 95]. La translocation de la PKC ϵ de la fraction cytosolique vers la fraction membranaire est un élément majeur de l'activation de cette isozyme [134]. L'activation de la PKC est connue pour induire la phosphorylation de protéines myocardiques. Plusieurs études suggèrent que la PKC active par phosphorylation les canaux K_{ATP}, [86, 87], induisant une diminution de la concentration intracellulaire en calcium [135]. De plus, l'activation de la PKC ϵ , dans le PC ischémique et pharmacologique, déclenche une cascade de signalisation qui induit la fixation de facteurs de transcription (comme NF κ B) sur le promoteur de la iNOS et confère ainsi la synthèse de nouvelles protéines iNOS responsables du phénotype préconditionnant [136, 137]. Nous avons montré que les canaux K_{ATP} et la iNOS semblent impliqués dans la réponse protectrice à l'HI. Le rôle cardioprotecteur de la PKC dans cette réponse peut donc potentiellement s'expliquer par une activation des canaux K_{ATP} et/ ou de la iNOS.

Dans cette deuxième étude, nous avons montré que la chélérythrine, injectée avant le PC hypoxique, ne modifie pas ces effets bénéfiques. A notre connaissance, c'est la première démonstration que la PKC ne joue pas le rôle de trigger d'un PC retardé. Ce résultat diffère de ce qui est obtenu généralement avec les diverses formes de PC retardé, dans lesquels la PKC initie la protection. Cependant, ce résultat est en accord avec certaines études portant sur le PC ischémique classique. Il a en effet été montré que l'inhibition de la PKC n'altère pas la réduction de la taille de l'infarctus induite par le PC chez le chien [138]. De plus, une étude montre que l'inhibition de la PKC pendant le PC n'a pas d'effet sur la cardioprotection alors

que la même inhibition juste avant l'ischémie prolongée abolit complètement l'effet du PC [139].

Dans notre modèle, la PKC semble donc avoir essentiellement un rôle de médiateur du PC hypoxique.

Les canaux K_{ATP} mitochondriaux

L'effet protecteur de l'HI sur la taille de l'infarctus est aboli par le 5-HD, un bloqueur des canaux K_{ATP} mitochondriaux. Ces canaux K_{ATP} ont été impliqués dans la protection myocardique retardée associée au PC ischémique [140]. Zhu et collaborateurs [141] montrent que les canaux mito K_{ATP} sont impliqués dans la protection cardiaque induite par l'HI en éliminant la surcharge calcique pendant l'I/R. L'hypoxie chronique provoque une cardioprotection chez le lapin qui peut s'expliquer par les canaux K_{ATP} au niveau du sarcolemme et de la mitochondrie [142]. Ces canaux semblent donc être des médiateurs potentiels de la réponse protectrice du PC hypoxique.

Le NO

La première étude exposée dans ce document [143] nous a permis de mettre en évidence, in vitro, l'implication du NO comme médiateur de la réponse protectrice de l'HI. En effet, le L-NAME, inhibiteur non spécifique des NOS, administré 24 heures après le stimulus préconditionnant, abolit la réduction de la taille de l'infarctus provoquée par le PC hypoxique. Le rôle du NO dans la médiation du PC retardé a largement été décrit dans la littérature pour expliquer les effets protecteurs du PC retardé [25], notamment dans le PC ischémique [64-66] et hyperthermique [144]. Nous avons observé que l'HI améliore le débit coronaire à la reperfusion par rapport au groupe normoxique. Cet effet peut en partie s'expliquer par le NO, en effet, il a été montré que le NO protège le myocarde en augmentant le débit coronaire [145, 146].

Dans ces mécanismes cardioprotecteurs, l'origine du NO semble préférentiellement dépendante de la NOS inductible (iNOS) [147] puisque l'administration d'un inhibiteur spécifique de cette isoforme (aminoguanidine ou 1400W), abolit la protection myocardique induite par le PC retardé [32, 64, 144]. D'autre part, plusieurs études montrent une

surexpression de la iNOS suite au PC retardé ischémique [66] et hypoxique [29] chez la souris. Dans notre modèle, le fait que la perfusion d'aminoguanidine, avant l'ischémie, abolisse les effets du PC hypoxique sur la taille de l'infarctus et le débit coronaire suggère que l'isoforme préférentiellement impliquée est la iNOS. Ce résultat est en accord avec les observations de Ding et collaborateurs [92] dans leur modèle de PC conféré par l'HI d'altitude. Bien que nous n'ayons pas réussi à montrer une expression de la protéine iNOS suite à l'HI, il semble cohérent de croire à l'implication de cette protéine dans notre modèle. En effet plusieurs études suggèrent que la iNOS est induite en réponse à une diminution de l'oxygène dans plusieurs tissus, notamment dans les cardiomyocytes [148, 149].

La protection myocardique conférée par le PC hypoxique semble donc impliquer les canaux K_{ATP} mitochondriaux et la iNOS comme médiateurs. De plus, par rapport à ce qui est classiquement retrouvé pour d'autres formes de PC retardé, la PKC semble jouer un rôle d'effecteur final de la protection plutôt qu'un rôle d'initiateur.

5.4 Conclusion et perspectives

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence un effet préconditionnant de l'HI chez le rat, sur un modèle de cœur isolé perfusé. Nous avons démontré que l'intensité de l'hypoxie (10% d' O_2), sa durée (4 heures) et les séquences de réoxygénation, donc le caractère intermittent de cette hypoxie, sont trois facteurs nécessaires pour induire un PC retardé.

Le PC induit par l'HI mettrait en jeu des voies de signalisation complexes, également rapportées pour d'autres types de PC retardé. Notamment, les MAP kinases semblent jouer un rôle important dans l'initiation du PC hypoxique. En revanche, contrairement à ce qui est couramment observé pour les PC retardés, la PI3K et la PKC ne semblent pas nécessaires au déclenchement de la réponse protectrice induite par l'HI. Enfin, suite à un stress hypoxique intermittent aigu, la PKC, les canaux K_{ATP} et la iNOS paraissent indispensables *in fine* pour

induire la protection. Ce travail a mis en évidence un rôle potentiel du NO dans la protection induite par le PC hypoxique. La iNOS serait l'isoforme impliquée dans cette production de NO. Ce résultat a été complété, et l'implication du NO confirmée, au sein du laboratoire à l'occasion d'un autre travail de thèse. En effet, la fixation du facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF-1) sur le promoteur du gène de la iNOS dans le PC hypoxique a été caractérisée de façon spécifique (Belaidi et collaborateurs, soumis à Cardiovascular Research). Il serait intéressant et complémentaire d'envisager une étude qui démontrerait une interaction entre la PKC et l'activation des canaux mitoK_{ATP}. Nous pourrions envisager, par exemple, de mesurer le potentiel rédox de la matrice mitochondriale, qui reflète l'activité du canal mitoK_{ATP}, avec ou sans chélérythrine. Il est fort possible que la PKC joue un rôle sur l'expression des NOS. Après avoir démontré l'activité de la iNOS par une méthode appropriée, nous pourrions étudier si cette activité est modifiée en présence d'un inhibiteur de la PKC.

Nous avons également vu qu'une HI de 4 heures à 5% d'O₂ aggrave la taille de l'infarctus suite à une séquence d'ischémie-reperfusion. Il a été montré dans notre laboratoire [114] que ce stress, appliqué de façon chronique, induit également une augmentation de la taille de l'infarctus chez le rat. L'HI à 5% est donc cardio-délétère dès 4 heures d'exposition et ce phénomène est également retrouvé après 35 jours d'exposition. Il serait nécessaire de mieux comprendre les mécanismes responsables de cet effet délétère de l'HI sur le myocarde afin d'envisager des thérapies spécifiques.

**2^{ème} PARTIE : RÉPONSE INFLAMMATOIRE INDUITE
PAR L'HYPOXIE INTERMITTENTE CHRONIQUE**

6 Introduction

Le SAOS est caractérisé par la répétition d'épisodes d'obstructions partielles ou totales des voies aériennes supérieures pendant le sommeil. Cette occlusion conduit à une diminution de la saturation en O₂ et à une fragmentation du sommeil. La sévérité du SAOS est mesurée par l'indice d'apnées-hypopnées (IAH), correspondant au nombre d'apnées et d'hypopnées par heure de sommeil. Plus cet indice est élevé, plus les symptômes sont sévères. Un IAH < 5 par heure reflète une situation normale, un IAH entre 5 et 15 un SAOS léger, entre 15 et 30 un SAOS modéré et > à 30 un SAOS sévère. Le SAOS se caractérise par des symptômes nocturnes, tels que le ronflement, un sommeil non réparateur et des pauses respiratoires perçues par le conjoint, ainsi que par une somnolence diurne. En plus des conséquences délétères comme la somnolence diurne et les « déficits » cognitifs, le SAOS est également associé à une augmentation du risque cardiovasculaire. Les patients SAOS présentent fréquemment une hypertension artérielle, une insuffisance cardiaque, et développent de l'athérosclérose. Cependant, les mécanismes par lesquels le SAOS affecte le système cardiovasculaire sont peu connus. De nombreux « indices » suggèrent que la composante « hypoxie intermittente » (HI) est incriminée dans la physiopathologie du SAOS. Les effets du stimulus d'HI sur les réponses physiologiques semblent cumulatifs. Le caractère aigu ou chronique de l'exposition détermine la nature de la réponse : protectrice ou délétère [97]. Dans le cadre du SAOS, l'HI est chronique et de ce fait engendre des effets délétères. Cette seconde partie s'attachera plus particulièrement aux effets délétères induits par l'HI chronique.

6.1 Conséquences cardiovasculaires du SAOS

Au cours du SAOS, chaque épisode d'obstruction pharyngée s'accompagne d'efforts inspiratoires intenses et d'une désaturation progressive en oxygène. La majorité des apnées se termine par un micro-éveil, à la suite duquel la ventilation reprend. Lorsque le patient s'est endormi, une nouvelle apnée survient et le cycle se répète. Les patients porteurs d'un SAOS

sont donc exposés simultanément et de manière répétée à une HI, une fragmentation du sommeil et des variations intenses de pression intra-thoracique.

Le SAOS a des conséquences neuropsychologiques, endocriniennes et métaboliques. Depuis plusieurs années, le lien entre le SAOS et la morbi-mortalité cardiovasculaire a été mis en évidence. Ce n'est que récemment que des études épidémiologiques de grande envergure ont permis de conclure que le SAOS est un facteur de risque indépendant de pathologies cardiovasculaires [150, 151] telles que l'hypertension artérielle, les coronaropathies, les arythmies, l'insuffisance cardiaque et l'hypertrophie ventriculaire gauche. Seront détaillées dans ce chapitre l'hypertension artérielle et la coronaropathie associées au SAOS.

6.1.1 Hypertension artérielle

L'association entre SAOS et hypertension artérielle (HTA) a été démontrée indépendamment de l'âge, de l'obésité et d'autres facteurs confondants [153, 154]. Cette relation semble linéaire entre la sévérité du SAOS et l'HTA [150, 155]. D'autre part, le traitement du SAOS améliore l'HTA. En effet, deux études ont montré une réduction faible mais significative de la pression artérielle (PA) chez des patients apnéiques traités par pression positive continue (PPC), traitement de référence du SAOS. Cette réduction est d'autant plus marquée que les patients présentent un SAOS sévère [156, 157].

Cette relation entre SAOS et HTA a été confirmée expérimentalement. Chez le chien, la répétition d'apnées obstructives expérimentales pendant le sommeil est suivie d'une augmentation de la PA diurne. Celle-ci revient progressivement à la normale lorsque l'on rétablit une respiration nocturne normale [158]. Les études expérimentales ont permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du SAOS contribuant au développement de l'HTA, et notamment de mettre en évidence le rôle de l'HI.

Une exposition chronique à l'HI entraîne, chez le rat, une augmentation de la PA systémique [159, 160]. Cette élévation de la PA a été retrouvée dans notre laboratoire [114]. Des mécanismes physiopathologiques mettant en jeu le système nerveux sympathique ont été

suggérés pour expliquer la relation entre HTA et HI. En effet, la stimulation des chémorécepteurs carotidiens par l'HI entraîne une vasoconstriction systémique globale qui contribue à l'élévation de la PA [161, 162]. De plus, l'hyperactivité sympathique, en partie provoquée par la désaturation [163], semble contribuer indirectement à l'élévation chronique de la PA [164].

6.1.2 Coronaropathie

La maladie coronarienne qui s'instaure de façon progressive est initiée par des lésions au niveau des parois des artères coronaires. Ces lésions déclenchent un processus complexe de remodelage de la paroi, dont les processus d'athérosclérose. Ces mécanismes se traduisent par un épaissement de la paroi artérielle qui provoque une diminution du flux sanguin irriguant le coeur. La complication la plus dangereuse et la plus fréquente de la maladie coronarienne est l'infarctus du myocarde.

Plusieurs études cliniques ont évalué la prévalence des accidents coronariens chez les patients SAOS. Koskenvuo et collaborateurs ont été les premiers à observer une association entre SAOS et coronaropathie [165] en mettant en évidence un risque relatif d'angor chez les hommes ronfleurs, indépendamment de l'âge, du niveau de la PA et de l'indice de masse corporelle. Une étude suédoise montre que le SAOS augmente le risque de mortalité de patients présentant une coronaropathie [166]. Il a été montré que le risque relatif d'accidents coronariens augmente avec la sévérité du SAOS, appréciée par l'IAH [167].

Réciproquement, le SAOS pourrait être un indicateur de pronostic chez les patients ayant des antécédents d'infarctus du myocarde : les résultats d'une étude menée sur des patients porteurs d'une coronaropathie ont montré une augmentation significative de la mortalité chez les patients apnéiques [166].

Il ne s'agit sûrement pas d'une fatalité puisque le traitement par PPC réduit significativement le risque d'événements cardiovasculaires de patients porteurs d'un SAOS sévère [168].

6.2 Mécanismes potentiels reliant le SAOS aux maladies cardiovasculaires

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour relier le SAOS aux maladies cardiovasculaires [169] : activation du système nerveux sympathique, dysfonction endothéliale vasculaire, stress oxydant, inflammation, troubles de la coagulation et dysrégulations métaboliques. Nous nous attacherons dans ce chapitre à décrire principalement l'inflammation et le stress oxydant observés suite au SAOS.

6.2.1 Inflammation

La participation d'un processus inflammatoire dans la genèse de l'athérosclérose est bien établie. L'athérosclérose est une lésion anatomique touchant l'intima des artères de gros et moyen calibre. Elle consiste en une accumulation locale de lipides, de polysaccharides, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media.

L'inflammation est un élément important dans la progression des maladies cardiovasculaires [170], notamment dans la maladie cardiaque ischémique et dans l'insuffisance cardiaque. La réponse inflammatoire des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses passe par l'expression de cytokines pro ou anti-inflammatoires, de chimiokines, de facteurs de croissance, de molécules d'adhésion et de métalloprotéases matricielles. Les sources principales de ces cytokines sont les leucocytes (monocytes, lymphocytes T).

6.2.1.1 Le processus d'athérosclérose

De façon générale, les lipoprotéines de faible densité (LDL), qui transportent le cholestérol du foie vers les tissus périphériques, interviennent lors des premières étapes du processus d'athérosclérose. Les LDL pénètrent dans la paroi, s'accumulent dans l'intima où elles sont modifiées soit par oxydation soit par attaque enzymatique. Les cellules endothéliales sont activées et les LDL capturées par les macrophages (Figure 9, 1). Les macrophages infiltrant la lésion entretiennent une réaction inflammatoire chronique faisant intervenir des cytokines pro-inflammatoires. Ces dernières permettent la libération de chimiokines (telles que MCP-1) par les cellules de la plaque provoquant ainsi le recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium. Elles induisent également l'expression des molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1) par les cellules endothéliales, ce qui favorise le roulement et l'adhésion des monocytes à l'endothélium. Le processus se poursuit par la migration des monocytes dans la paroi vasculaire. Les monocytes se différencient alors en macrophages qui induisent l'activation et la libération de cytokines, de chimiokines, de radicaux, provoquant ainsi une inflammation et un dommage tissulaire (Figure 9, 2). Une activation des lymphocytes T se produit également dans la lésion, elle conduit à la production de cytokines conduisant à l'inflammation (Figure 9, 3). Les cellules inflammatoires, qui sont présentes à tous les stades d'évolution de l'athérosclérose, favorisent le développement des lésions, induisent la progression de la plaque et en favorisent la rupture. L'athérosclérose n'est pas uniquement un phénomène local, mais devient, au cours de son évolution, une maladie inflammatoire systémique.

6.2.1.2 Les chimiokines

Les chimiokines constituent une famille de petites protéines (6 à 15 kDa) sécrétées principalement par les globules blancs et les leucocytes. Les protéines de cette famille ont une propriété particulière commune : le chimiotactisme. C'est-à-dire qu'elles sont capables d'attirer leurs cellules cibles, en particulier les leucocytes, et de faire en sorte que ces derniers quittent rapidement les vaisseaux sanguins pour venir s'accumuler sur les sites où se produit

une infection ou une inflammation. Il existe, d'un point de vue fonctionnel, deux groupes de chimiokines, les chimiokines lymphoïdes et les chimiokines inflammatoires. Ces dernières sont synthétisées dans les tissus et les leucocytes en réponse à des pathogènes et à des stimuli pro-inflammatoires. Leurs récepteurs sont exprimés sur les cellules phagocytaires comme les neutrophiles, les monocytes. Elles jouent un rôle dans l'inflammation. Parmi les chimiokines pro-inflammatoires, on trouve MCP-1, RANTES et MIP-1 α .

- MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) est produite par les macrophages et est responsable, *in vivo*, de la migration des monocytes sur le site inflammatoire et de l'induction de l'expression d'intégrines nécessaire au chimiotactisme.

- RANTES (Regulated Upon Activation Normal T Cell Expressed and Secreted) est produite principalement par les cellules T (CD8+), les cellules épithéliales, les fibroblastes et les plaquettes durant l'inflammation. Sur le site de l'inflammation, RANTES favorise l'infiltration des leucocytes. Une augmentation de l'expression de RANTES est associée à de nombreuses pathologies et désordres de l'inflammation comme l'athérosclérose.

- MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein) α , β , γ , sont produites notamment par les macrophages, les lymphocytes et les plaquettes. Les protéines de la famille MIP provoquent une forte réponse inflammatoire chronique sur les sites d'une inflammation et ce, en recrutant les cellules pro-inflammatoires. Elles sont indispensables au chimiotactisme des lymphocytes T depuis le sang vers le locus de l'inflammation et jouent également un rôle important dans la régulation de la migration des monocytes.

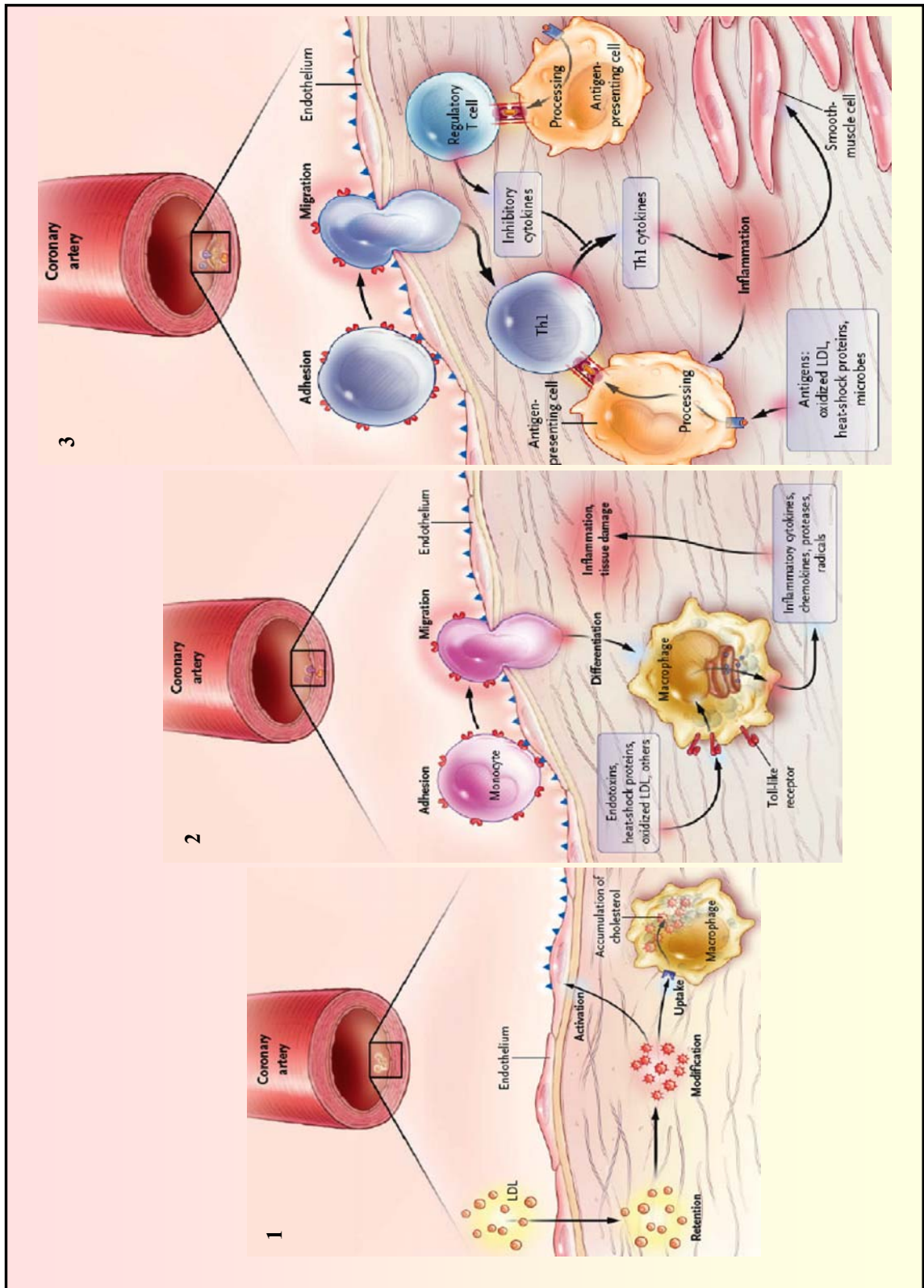


Figure 9 : Infiltration des LDLs (1), rôle des macrophages (2) et activation des lymphocytes T (3) dans l'inflammation artérielle [171].

Plusieurs travaux suggèrent l'existence d'une inflammation dans le SAOS. En effet, les concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α sont élevées chez les patients SAOS [172-174]. De plus, le SAOS provoque l'élévation d'autres médiateurs de l'inflammation, comme les molécules d'adhésion [175] et la CRP [176, 177]. La protéine C-réactive (CRP) pourrait contribuer à la maladie vasculaire en inhibant la NO synthase et en augmentant l'expression de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM et PECAM). L'IL-1 et le TNF- α stimulent également la synthèse de ces molécules.

Les concentrations sériques des molécules d'adhésion ICAM, de VCAM et de la L-sélectine sont élevées chez les patients SAOS [178, 179]. L'augmentation des taux circulants de ces molécules reflète un état activé, c'est-à-dire, inflammatoire, de l'endothélium. De plus, une activation leucocytaire a été observée chez les patients SAOS [180]. L'activation de ces cellules provoque l'adhésion des leucocytes circulants à l'endothélium, étape initiale de certaines complications cardiovasculaires comme l'athérosclérose [181, 182].

Très récemment, il a été montré que la sévérité de la désaturation en oxygène chez les patients SAOS induit une augmentation de l'épaisseur intima media carotidienne, EIM [183]. Ce résultat suggère que l'augmentation de l'EIM est une conséquence cardiovasculaire précoce du SAS. De plus, cette augmentation a été corrélée aux concentrations de molécules pro-inflammatoires décrites précédemment, telles les interleukines 6 (IL-6) et 18 (IL-18) et la CRP, dans le sérum de patients SAOS [152].

6.2.2 Stress oxydant

L'alternance de phases d'hypoxie et de réoxygénation au cours du SAOS constitue une circonstance favorable à la production de radicaux libres (RL). Le stress oxydant est par ailleurs connu pour potentialiser les maladies cardiovasculaires.

Les radicaux dérivent soit de réductions monoélectroniques de l'oxygène, tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), soit de l'azote, tel le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). D'autres

espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

Les RL sont à l'origine de lésions potentiellement délétères au niveau cellulaire. Ainsi, ils induisent des cassures et des mutations de l'ADN, inactivent des protéines, oxydent les sucres et provoquent un processus de peroxydation lipidique. Les RL dans le SAOS sont en premier lieu produits par la mitochondrie et les leucocytes inflammatoires.

L'augmentation de RL au cours du SAOS a été mise en évidence aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme [184].

Les lipides sont la cible privilégiée de l'attaque radicalaire. Cette réaction, appelée peroxydation lipidique, peut concerner les lipoprotéines circulantes. L'attaque des LDL aboutit à la formation de LDL oxydées qui, captées par des macrophages à l'intérieur de la paroi vasculaire, forment le dépôt lipidique à l'origine de la plaque d'athérome. Barcelo et collaborateurs ont rapporté un profil de peroxydation lipidique anormal chez les patients SAOS [185]. De plus, la mesure au réveil des concentrations plasmatiques de marqueurs de stress oxydant a montré une augmentation de la peroxydation des lipides chez les patients atteints de SAOS [186]. Ces patients présentent également une augmentation du taux de LDL oxydés [187]. Enfin, plusieurs études suggèrent un rôle de la réponse inflammatoire dans la production de RL chez les patients SAOS. En effet, les patients porteurs de SAOS présentent une augmentation des RL par les neutrophiles [188] et les monocytes [180]. De plus, cette augmentation est corrélée avec l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales [180], ce qui témoigne d'une activation leucocytaire dans le SAOS.

Les séquences d'hypoxie-réoxygénation, à l'instar des séquences d'ischémie-reperfusion, sont à l'origine d'une production de RL. Au niveau cérébral, des études sur les rongeurs montrent que la peroxydation lipidique [189] et la production de RL [190] sont dues à l'HI. Au niveau cardiaque, la peroxydation lipidique est augmentée dans le ventricule gauche de rats exposés à l'HI chronique [191] et l'ischémie-reperfusion induit une peroxydation lipidique, majorée par l'HI chronique chez la souris [192].

6.3 Modèles expérimentaux animaux

L'intérêt des modèles animaux réside dans le fait qu'ils permettent d'isoler l'effet de l'hypoxie intermittente (HI), en s'affranchissant des facteurs confondants classiques rencontrés chez les patients porteurs de SAOS comme l'obésité ou l'hypertension artérielle.

D'autre part, chez les patients SAOS, la sévérité de l'HI varie d'un sujet à l'autre et ses effets sont difficiles à différencier de ceux des micro-éveils et de l'hypercapnie. Les recherches expérimentales menées chez l'animal, permettent une meilleure compréhension des conséquences de l'HI sur le système cardiovasculaire.

Deux principaux modèles d'HI ont été développés. Le premier consiste à produire des apnées par occlusion intermittente et répétée des voies aériennes supérieures [158, 193]. Cette répétition d'apnées obstructives expérimentales pendant le sommeil conduit à une augmentation de la PA pendant la journée. Le deuxième est un modèle d'exposition chronique à l'HI. Ce modèle développé initialement par l'équipe de Fletcher consiste à placer des rats dans des cages individuelles en plexiglas et à les exposer à des cycles de 12 secondes d'hypoxie (3% d'O₂) et 18 secondes de réoxygénation (21% d'O₂), à raison de 2 cycles par minute, 8 heures par jour pendant la période de repos, pendant 35 jours. La mesure de la saturation en O₂ et des gaz du sang a permis de valider le retentissement de la baisse de la teneur en O₂ sur l'animal [159].

Les protocoles expérimentaux d'exposition chronique à l'HI sont très variés dans la longueur des cycles, le nombre d'épisodes hypoxiques par jour, et le nombre de jour d'exposition [114, 159]. Les animaux exposés à l'hypoxie sont habituellement comparés à des animaux contrôles « sham », soumis à un stimulus normoxique. Ce type de dispositif a également été utilisé chez la souris [194, 195] rendant ainsi possible l'étude de l'influence des facteurs génétiques sur la réponse à l'HI par l'utilisation de souris transgéniques.

L'HI seule semble suffisante pour induire une hypertension artérielle diurne [3, 196]. Cependant, selon les études, cette élévation de la pression artérielle n'est pas systématique [197], et lorsqu'elle existe ne se produit pas obligatoirement au bout du même délai [159, 198]. Cette disparité peut s'expliquer par la nature du stimulus (durée et profondeur de l'hypoxie, durée de l'exposition chronique).

7 Objectif de ce travail

Une cascade d'évènements, de l'hypoxie à la dysfonction endothéliale, a été proposée pour expliquer la morbidité cardiovasculaire du SAOS [199]. La production de radicaux libres et l'inflammation rencontrées chez les patients SAOS, sont des phénomènes qui semblent intimement liés. Ils conduisent à la dysfonction endothéliale, à l'origine du développement de l'athérosclérose. Il n'existe à ce jour aucune étude animale établissant un lien biologique direct entre la physiopathologie du SAOS et l'athérogenèse.

L'objectif principal de la deuxième partie de ce travail de thèse a été d'étudier les relations physiopathologiques entre hypoxie intermittente et athérogenèse. Pour cela, nous avons collaboré avec l'équipe de François Mach de l'Hôpital Universitaire de Genève, qui nous a permis de bénéficier de son expertise dans le domaine de l'athérosclérose.

L'évaluation et la caractérisation de la réponse inflammatoire induite par l'HI chez la souris sera présentée dans cette deuxième partie. Les techniques utilisées pour l'étude de l'inflammation seront détaillées dans la section matériel et méthodes ci-après. Les résultats seront présentés sous la forme d'une publication puis discutés.

8 Matériel et méthodes

8.1 Matériel biologique

Les expériences d'hypoxie chronique sont réalisées sur des souris mâles C57BL6J, pesant environ 25 g. Les animaux sont placés dans des conditions constantes de température et d'humidité avec des cycles de 12 heures de jour/12 heures de nuit et l'accès à l'eau et à la nourriture est libre.

Toutes les expériences ont été approuvées par la Direction des Services Vétérinaires de l'Isère, France.

Ces expériences ont été menées conformément à la loi française et aux directives des comités d'éthiques locaux pour la recherche sur l'animal.

8.2 Hypoxie chronique

Les souris sont placées dans les mêmes enceintes que celles décrites précédemment, mais soumises à des cycles d'hypoxie intermittente de 30 secondes, composés de 18 secondes de normoxie (21% d'O₂) et de 12 secondes d'hypoxie (5% d'O₂). Les souris sont exposées à l'HI 8 heures par jour pendant 5, 14 ou 35 jours. Des animaux contrôles normoxiques sont placés parallèlement dans des enceintes similaires où la fermeture et l'ouverture des électrovannes ne contrôlent qu'une entrée d'air. Les souris sont ensuite replacées dans les conditions standard de l'animalerie. Comme pour l'hypoxie aiguë, le taux d'O₂ dans les enceintes est contrôlé tout au long du protocole.

8.3 Dosage sanguin

A la fin de l'exposition à l'hypoxie ou à la normoxie, des prélèvements sanguins sont réalisés avant le sacrifice par ponction intracardiaque. Le sang est collecté sur des tubes EDTA en vue

du dosage plasmatique du cholestérol total (Infinity™ Cholesterol reagent Thermo Electron Corporation).

8.4 Microscopie intravitale

Après induction de l'anesthésie, par voie intrapéritonéale, avec un mélange 10: 1 de kétamine/xylazine (0,1 mL/10 g), les souris sont maintenues à la température de 37°C en décubitus latéral. Après une incision médiane de l'abdomen, l'intestin est extériorisé et une boucle délicatement dégagée afin d'étudier les vaisseaux du tissu mésentérique. Le tissu est maintenu à 37°C et humidifié tout au long de l'expérience par superfusion d'une solution de bicarbonate de sodium. Afin de visualiser les leucocytes, la rhodamine est injectée par voie intraveineuse (50 µL de rhodamine 6G 0,05%) 5 minutes avant la microscopie. Le roulement des leucocytes est observé à l'aide d'un microscope (Zeiss) à objectif à immersion (grossissement x 40). Les enregistrements sont réalisés avec une caméra haute résolution (Nikon sight DS) connectée à un système d'acquisition (ACT-2U). Pour chaque souris, le nombre de leucocytes roulants et le nombre de leucocytes adhérents sont déterminés dans trois veinules post-capillaires de diamètre 20-40 µm. Le nombre de leucocytes roulant correspond au nombre de cellules passant à un point fixe de la veinule par minute. Le nombre de leucocytes adhérent correspond au nombre de leucocytes stationnaires pendant 30 secondes sur une portion de vaisseau de 100 µm. L'analyse a été effectuée en aveugle et par deux opérateurs indépendants. Les résultats exposés correspondent à la moyenne des deux comptages.

8.5 Test de prolifération

Les splénocytes sont isolés des souris normoxiques ou hypoxiques exposées 5, 14 et 35 jours (n=6 par groupe) et mis en culture dans des plaques 96 puits à la concentration de $5 \cdot 10^6$ cellules/mL. Le milieu de culture (RPMI 1640) est complété avec du tampon HEPES 25 mM,

L-glutamine 2 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 0,1 mg/mL et FBS (foetal bovine serum) 10%. Les cellules sont stimulées en triplicat avec des concentrations variables de concanavalin A (Con A, Sigma), une glycoprotéine accumulée dans les graines du haricot canavalia (*Canavalia ensiformis*), qui stimule les lymphocytes T. Après 72 heures, la prolifération cellulaire est déterminée en utilisant le test de prolifération cellulaire MTS non radioactif (Promega).

8.6 Technique de RT-PCR en temps réel

La quantification par la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel s'effectue au moyen d'un thermocycleur ABI PRISM® 7700 SDS (Applied Biosystems) capable de réaliser l'amplification et de la mesurer en temps réel en se basant sur la lecture de la fluorescence émise par une sonde.

Les ARN totaux sont extraits de cellules isolées de la rate des souris en utilisant du Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc). Les ARNm codant pour MCP-1, MIP-1 α et RANTES sont spécifiquement quantifiés par Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) en temps réel à partir de 500 ng d'ARNm totaux.

L'étape de reverse transcription (permettant d'obtenir l'ADNc à partir de l'ARN extrait) correspond à 60 minutes de chauffage à 37°C et est réalisée avec le kit omniscrypt de Qiagen. Elle est suivie par la PCR en temps réel, correspondant à l'amplification de l'ADNc. Le programme de PCR utilisé est 2 minutes à 50°C, 10 minutes à 95°C, 15 sec à 95°C et 1 minute à 60°C, pour 45 cycles. Les primers proviennent de Applied Biosystems (Pre-developed Taq-Man assay reagent). La sonde de fluorescence utilisée est une sonde Taqman. Le signal de fluorescence est donc détecté, à chaque cycle, en fin de la phase de fixation des amorces. Ce signal est proportionnel au produit de PCR. La quantité obtenue à la fin d'une PCR n'est pas toujours significative, seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initiales. Un seuil est défini, il correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle et suffisamment élevé pour être

au dessus du bruit de fond. Le moment où le signal sort du bruit de fond correspond à un certain nombre de cycles, il est appelé le Ct (Threshold Cycle) (Figure 10).

La technique est validée en amplifiant, dans les mêmes conditions, les ARNm correspondant à un gène domestique dont l'expression est ubiquitaire et constitutive, ici le gène codant pour l'ARNr 18S (ARN ribosomique 18S). Les concentrations d'ARNm codant pour MCP-1, MIP-1 α et RANTES sont calculées grâce à la méthode de comparaison des Ct et exprimées en pourcentage des contrôles.

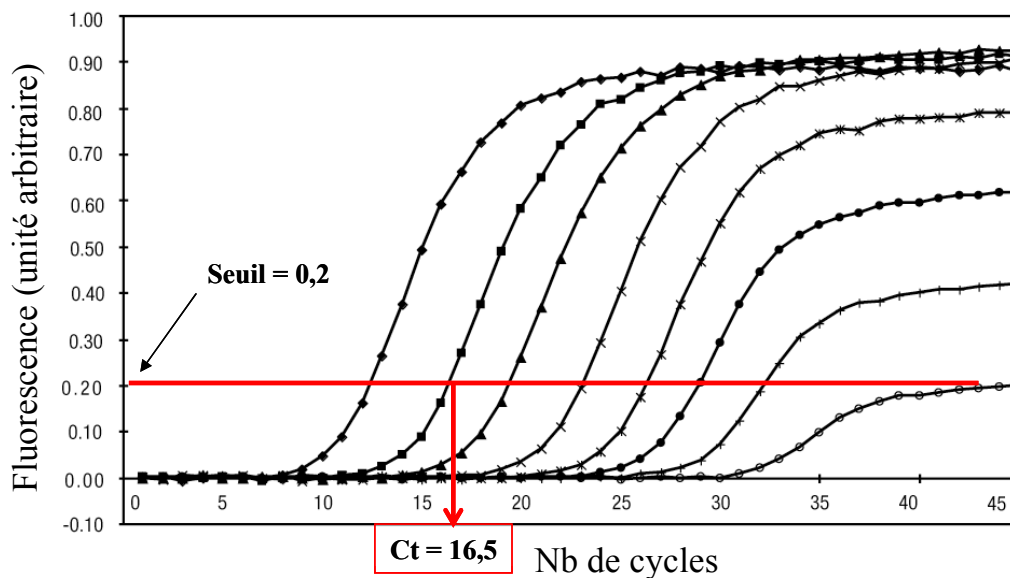


Figure 10 : Représentation d'amplifications par PCR et principe du Ct.

L'axe des abscisses correspond au nombre de cycles de la PCR, l'axe des ordonnées à la quantité du produit amplifié. La ligne rouge correspond au seuil fixé à 0,2. L'intersection de la courbe d'amplification et du seuil donne un point en abscisse ayant la valeur de 16,5 cycles. Cette valeur correspond à la valeur du Ct.

8.7 Analyse statistique

Les données concernant le poids des souris, l'expression des ARNm et le roulement des leucocytes ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à 2 voies (facteur 1 : exposition et facteur 2 : temps). Lorsque celle-ci s'est révélée significative, le test de Bonferroni a été réalisé a posteriori. Concernant le test de prolifération, les données ont été comparées à l'aide d'un test de Student. Le risque d'erreur de 1^{ère} espèce α est fixé à 5% et le degré de significativité est fixé à 5% ($p < 0.05$).

9 Résultats

9.1 Développement d'un processus inflammatoire suite à une hypoxie intermittente chronique

9.1.1 Etude 3 : L'hypoxie intermittente dans le syndrome d'apnées du sommeil induit une réponse inflammatoire chez la souris

“Intermittent Hypoxia in Obstructive Sleep Apnea Syndrome Induces Inflammatory Response in Mice”

*Claire Arnaud, *Pauline C. Béguin, Fabienne Burger, Graziano Pelli, Christophe Ribuot, Patrick Lévy, François Mach.

Soumis à l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

Résumé

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est une pathologie multifactorielle caractérisée par la présence d'épisodes d'hypoxie intermittente (HI) nocturne. Sa prévalence s'élève dans la population d'âge moyen, à 4% chez les hommes et 2% chez les femmes [200]. Le SAOS est associé à de nombreuses pathologies cardiovasculaires qui sont probablement en cause dans la morbidité cardiovasculaire plus élevée chez ces patients par rapport à la population générale. En effet, le SAOS est à l'origine de modifications vasculaires, notamment d'une inflammation [201] suggérée par l'augmentation de la concentration de cytokines circulantes (IL-6, TNF- α) [177, 202] et de molécules d'adhésion [175, 178]. Des études expérimentales suggèrent que la composante hypoxie intermittente (HI) du SAOS serait à l'origine de ce processus inflammatoire [203].

Ce travail montre que les souris exposées à l'HI développent une réponse inflammatoire.

En effet, la stimulation des splénocytes de souris hypoxiques, par la concanavalin A, induit une élévation de la réponse proliférative du 5^{ème} au 35^{ème} jours par rapport aux souris contrôles.

De plus, l'extraction des ARNm des splénocytes montre que les marqueurs pro-inflammatoires sont augmentés suite à l'HI. L'expression de RANTES présente un pic à 14 jours, celle de MIP-1 α augmente de 5 à 35 jours. Ces chimiokines sont connues pour induire la migration des leucocytes. Ce résultat suggère donc que la régulation de l'expression de ces médiateurs peut être à l'origine du recrutement des leucocytes dans notre modèle.

Enfin, le roulement des leucocytes sur l'endothélium de la microvasculature mésentérique est augmenté chez les souris HI par rapport aux souris normoxiques. Le roulement des leucocytes est un stade précoce du développement de l'athérosclérose. Ce résultat confirme que l'HI peut induire un processus athérogène chez ces souris.

Une perte de poids initiale est observée chez les souris hypoxiques après 5 jours d'exposition. Le poids se stabilise du 5^{ème} au 35^{ème} jours. Les souris normoxiques ont un poids stable tout au long de l'exposition. L'exposition à l'HI induit également une augmentation de la concentration plasmatique du cholestérol total à 5 et 14 jours. A 35 jours cette concentration

se normalise. Ce résultat suggère donc que les effets de l'HI observés sur les paramètres inflammatoires à 35 jours ne sont pas dépendants d'une hypercholestérolémie.

En résumé, ces résultats suggèrent une activation du processus inflammatoire chez les souris exposées à l'hypoxie intermittente chronique.

Intermittent Hypoxia in Obstructive Sleep Apnea Syndrome Induces Inflammatory Response in Mice

*Claire Arnaud^{1,2}, *Pauline C. Béguin², Fabienne Burger¹, Graziano Pelli¹, Christophe Ribuot², Patrick Lévy², and François Mach¹

¹From the Division of Cardiology, Foundation for Medical Research, Faculty of Medicine, Geneva University Hospital, Switzerland; ²Laboratoire HP2, EA 3745, INSERM ERI 0017, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

* These two authors contributed equally to this work

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Claire Arnaud, PharmD PhD, Laboratoire HP2, EA 3745, INSERM ERI 0017, Faculté de Médecine-Pharmacie, Domaine de la Merci, 38706 Grenoble, France. E-mail: claire.arnaud@ujf-grenoble.fr
Fax: +33 476 63 71 78; Tel: +33 476 63 75 18

Supported by research grants from the Association Grenobloise des Insuffisants Respiratoires to C.R. and from the Swiss National Science Foundation to F.M. (#3200BO-105896). P.C.B. is recipient of doctoral fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France) and C.A., from the Fondation pour la Recherche Médicale (France). C.A., F.B., G.P., F.M. belong to the European Vascular Genomics Network (<http://www.evgn.org>) a Network of Excellence supported by the European Community.

Running Title: Hypoxia induces inflammation.

The descriptor number 112 seems to best classify the research presented in this article.

Word count for the body of the manuscript (excluding abstract and references): 2233

The findings presented in the manuscript provide a new insight into the mechanism of the relationship between intermittent hypoxia, a major consequence of OSAS, inflammation, and atherosclerosis, suggesting that intermittent hypoxia is likely to be an important mediator of

cardiovascular diseases, in particular atherogenesis. Furthermore, the results of this paper not only open a window on the understanding of the pathophysiology of OSAS, but may also allow identifying different processes induced by intermittent hypoxia and further manipulate the intermittent hypoxia-related inflammatory response and subsequent atherosclerosis in OSAS patients.

Abstract

Rationale and Objective: Obstructive sleep apnea syndrome is characterized by intermittent hypoxia and is correlated to an increase in cardiovascular morbidity, with a high risk of hypertension, coronary artery disease, arrhythmias and cerebrovascular complications. The aim of the present study was to investigate the inflammatory response of mice exposed to intermittent hypoxia and to characterize the possible link between hypoxia, inflammation and atherogenesis.

Methods and Results: Exposure of C57BL/6J mice to intermittent hypoxia or normoxia for 5, 14 or 35 days resulted in a significant increase in proliferation capacity of spleen-derived T-cells. Moreover, intermittent hypoxia considerably induced expression of the chemokines Regulated on Activated Normal T-cell Expressed and Secreted, macrophage inflammatory protein 1 α , and to a lesser extent monocyte chemoattractant protein-1, as revealed by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Leukocyte rolling, measured *in vivo* using intravital microscopy in mice exposed to hypoxia, was significantly increased at day 35 of exposure. Serum level of total cholesterol was increased at day 5 and 14 of exposure returning to the level of normoxic control at day 35.

Conclusions: These data demonstrate an inflammatory response in mice exposed to intermittent hypoxia which may better explain some of the cardiovascular complications of the obstructive sleep apnea syndrome.

Key Words: cardiovascular disease; inflammation; atherosclerosis; chemokines

Word count: 204

Introduction

Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is characterized by repetitive episodes of upper airway collapses during sleep, leading to periods of intermittent hypoxia (IH) and sleep fragmentation. The consequences of the OSAS resulting from sleep fragmentation are mostly associated with the neurocognitive dysfunction (1), whereas cardiovascular diseases such as systemic hypertension, coronary diseases, arrhythmias, and stroke are likely resulting from the intermittent hypoxia (2). Although the mechanisms underlying the relationship between OSAS and cardiovascular morbidity are poorly understood, there is substantial evidence that OSAS is strongly associated with inflammation (3), which also plays a major role in atherosclerosis (4). Inflammation in OSAS has been attributed, in part, to systemic hypoxia (3). IH has been reported to increase oxidative stress and inflammation (5, 6). Moreover, IH has been shown to selectively activate inflammatory pathways in OSAS (7) thus suggesting a possible molecular mechanism of cardiovascular disease.

Systemic inflammation in OSAS is characterized by elevated levels of certain pro-inflammatory mediators and prothrombic factors that are also important in the development of atherosclerosis. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, C-reactive protein (CRP), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), important risk factors for atherosclerosis, are increased in patients with OSAS (8-10). Leukocyte adhesion, endothelial dysfunction, enhanced platelet activity and aggregation are common in both OSAS and atherosclerosis (11). Levels of circulating adhesion molecules, such as ICAM-1 and VCAM-1 and chemokines, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), shown to increase in parallel to atherosclerotic plaque formation, have been reported increased in OSAS patients (12). Furthermore, the increase of the carotid intima-media thickness, a critical feature of atherosclerosis, has been correlated to the increased serum levels of CRP, IL-6 and IL-18 in patients with OSAS (13). Taken together, these findings suggest that systemic inflammation in OSAS resulting, in part, from IH, has a potential role in the development of atherosclerosis. However, the underlying mechanisms of the association between IH in OSAS, inflammation, and atherosclerosis are not fully investigated.

In the present study we investigated the influence of IH on systemic inflammation in a rodent model of IH specifically evaluating the changes in inflammatory parameters present during atherosclerosis such as inflammatory cell proliferative response, chemokines expression pattern, leukocyte recruitment, and total serum cholesterol content.

Methods

Animals

Wild-type, male, C57BL/6J mice from Janvier Laboratories (Laval, France) were used in the study. The study conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). For all blood samples and surgical procedures, anesthesia was induced and maintained by ketamine-xylazine.

Experimental Design

C57BL/6J mice were divided in two groups for eventual exposure either to normoxia (control) or intermittent hypoxia (IH) (n=5 or 6 mice per group) for 5, 14 or 35 days. An established model of IH, adapted for mice, was utilized as previously described (14). During each period of IH, the O₂ level was reduced from 20.9 to 4.8-5.0 % over a 12 sec period and then rapidly reoxygenated to room air levels in the subsequent 18 sec period. The 30-sec cycle was repeated for 8 hrs during daytime. In order to expose control mice to similar noise and airflow disturbances, a compressed air at the same flow rate was distributed to normoxic chambers. Animals were sacrificed 24 hrs after the last exposure period.

Proliferation Assay

Splenocytes were isolated from mice exposed to normoxia or IH for 5, 14 or 35 days (n=6 per group) and cultured in 96-well plates at a concentration of 5×10^6 cells.ml⁻¹. Culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES buffer, 2 mM L-glutamine, 100 U.ml⁻¹ penicillin, 0.1 mg.ml⁻¹ streptomycin and 10% heat-inactivated FBS. Cells were stimulated in triplicates with varying concentrations of concanavalin A (Sigma). After 72 hrs, cell proliferation was determined using a non-radioactive MTS cell proliferation assay (Promega) according to the manufacturer's guidelines.

Analysis of Gene Expression by Real-Time Quantitative RT-PCR

Total mRNA was extracted from splenocytes of mice exposed either to normoxia or IH and isolated with Tri-reagent (MRC, Inc) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (ABI Prism 7000 Sequence Detection system, Applied Bio-systems) was used to determine the mRNA expression of RANTES, MIP-1 α , and MCP-1 as previously described (15). Each sample was

analyzed in triplicate and normalized in multiplex reaction with the use of TaqMan eukaryotic 18S control (TaqMan Reagent, Applied Biosystems; VIC labelled). Data were analyzed using ABI Prism software, and the fold induction of mRNA levels was calculated by the comparative C_t method (Applied Biosystems).

Intravital Microscopy

Intravital microscopy of the mesentery microvasculature was performed in mice exposed to normoxia or IH during 5, 14 or 35 days. To visualize leukocytes, animals were injected intravenously with 0.05 ml of 0.05% rhodamine 6G (Sigma) 5 min before microscopy. Leukocyte rolling was then observed microscopically as previously described (16). The number of rolling leukocytes was determined by two independent operators in five post-capillary venules of 20- to 40- μm diameter for each mouse, as the number of rolling cells moving past a fixed point on the venular wall per 30 seconds.

Blood Analysis

For measurements of cholesterol content, blood samples were collected at day 0, 5, 14, and 35 of IH or normoxia. Total cholesterol of sera was measured using the Infinity™ Cholesterol reagent (Thermo Electron Corporation) according to the manufacturer's guidelines.

Statistical analysis

The results were reported as the means \pm SEM. For total mRNA content, leukocyte rolling, and cholesterol level, statistical significance was assessed by two-way analyses of variance (ANOVA), with exposure and time corresponding to each factor, with *post-hoc* Bonferroni test for multiple comparisons. For proliferation analysis, different groups were compared using *t*-test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Spleen-derived T-cells Proliferation

To evaluate the inflammatory response of mice on IH exposure, we first analyzed inflammatory cell proliferation capacity. Short-term exposure of mice to IH for 5 days resulted in a significant 1.28-fold increase in proliferation of splenocytes as compared with that of the mice exposed to normoxia (intermittent air) (Figure 1). Similar to 5 days IH exposure (128% of control value), exposure of mice to IH for 14 and 35 days also showed an increasing effect on splenocyte proliferation (124% for day 14, and 131% for day 35) as compared with that of normoxic controls. However, no significant changes in proliferation were noted between different time points of exposure.

mRNA Analysis of Proinflammatory Molecules

Since splenocyte proliferation was considerably increased in the animals exposed to IH, we examined the expression of proinflammatory chemokines, potent activators and chemoattractant signals expressed at inflammation sites (17), such as Regulated on Activated Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein 1 α , (MIP-1 α), and MCP-1, in spleen tissue of mice exposed either to normoxia or to IH. Exposure of mice to IH resulted in a significant, as compared with that of mice exposed to normoxia, increase in mRNA expression of RANTES, peaking within 14 days of exposure (2.6-fold increase as compared with normoxic controls) and returning to the basal level after 35 days of exposure (Figure 2A). MIP-1 α mRNA content was also increased by IH (Figure 2B). When mice were exposed for 5 days to IH there was a 6.4-fold induction in MIP-1 α expression as compared with control, whereas IH exposure for 14 and 35 days had no statistically significant effect on MIP-1 α expression. Unlike RANTES or MIP-1 α , MCP-1 mRNA expression did not appear affected by IH, since we observed only a slight insignificant increase of MCP-1 mRNA after 14 or 35 days of exposure to IH (Figure 2C).

Leukocyte rolling

Because chemokines are known to mediate cell recruitment in inflammation (15, 18) and their expression was considerably increased by IH (Figure 2), we examined whether IH affects the initial step of lymphocyte recruitment - lymphocyte rolling, *in vivo* in our model. We assessed the leukocyte rolling within the mesenteric vasculature using intravital microscopy in mice

exposed to IH for 5, 14, and 35 days. During 5 days of exposure to IH, no significant changes were found in leukocyte rolling in mice as compared with control animals exposed to normoxia (Figure 3). However, further exposure of mice to IH showed a 1.36- fold increase in leukocyte rolling for day 14, with maximal 2.15-fold increase observed for day 35 (Figure 3).

Serum Cholesterol Levels in Mice Exposed to Normoxia or Intermittent Hypoxia

Since cholesterol is one of the major cardiovascular risk factors, we examined the serum levels of total cholesterol in animals exposed to hypoxia. Exposure of mice to IH resulted in an significant increase in cholesterol level peaking at 14 days of exposure and returning to the basal level at day 35 (Figure 4). Short-term exposure of mice to IH for 5 and 14 days increased the total serum cholesterol level 1.22-fold and 1.40-fold as compared with day 0 (Figure 4). Whereas long-term IH exposure of 35 days showed an insignificant decrease of cholesterol content, as compared with day 14, subsequently returning to the basal level of day 0. When mice were exposed to normoxia, there was no statistically significant increase in serum cholesterol content (Figure 4).

Discussion

The purpose of the present investigation was to study the impact of IH, a key manifestation of OSAS, on the inflammatory response in mice and to investigate the possible link between IH, inflammation and atherosclerosis. The findings presented here demonstrate, for the first time in IH mice model, that exposure to IH induces an inflammatory response as evidenced by: a) an increase in proliferation of spleen-derived T-cells; b) an upregulation of gene expression of several pro-inflammatory mediators; c) an increase in leukocyte rolling on the endothelial cell layer *in vivo*; and d) an increase in the major cardiovascular risk factor, cholesterol content.

Lymphocytes (T cells) represent an important cellular subtype involved in inflammatory diseases such as atherosclerosis (3, 19). Once activated, they proliferate and secrete inflammatory mediators such as chemokines or cytokines (3). A significant number of studies demonstrates the implication of various chemokines in the pathophysiology of atherosclerosis (15, 17, 18). Our data show that IH causes an elevation in proliferation capacity of spleen-derived T cells in mice exposed to IH for 5, 14 and 35 days as compared with normoxic controls (Figure 1). Moreover, this increase in proliferation was accompanied by an upregulation of gene expression of several chemokines. IH significantly increased the expression of the chemokines RANTES and MIP-1 α , and to a lesser degree MCP-1, as revealed by mRNA analysis (Figure 2). These data suggest that the hypoxic stress caused by OSAS activates proliferation of splenocytes and that may be the mechanism by which RANTES and MIP-1 levels are increased.

Chemokines are known to induce leukocyte migration, growth and activation, and regulate leukocyte trafficking during inflammation (20). We have previously shown that a treatment with an analogous antagonism of RANTES reduces atherosclerotic plaque formation in LDLR knock-out mice (17). *In vitro* studies showed that MIP-1 α chemoattracts many leukocytes, including T cells, monocytes and neutrophils to the site of inflammation, and neutralizing antibodies to MIP-1 α have been shown to decrease inflammation by limiting monocyte and lymphocyte recruitment (21). Thus, in our model, upregulation of RANTES, MIP-1 α and, to a lesser extent, MCP-1, may participate to the increase in leukocyte recruitment.

The leukocytes recruitment is an important process in atherogenesis and the first step of this event involves leukocyte rolling on the endothelial cell layer (22). Using the intravital microscopy of the mesenteric microvasculature, we observed a significant increase of leukocyte rolling in mice exposed to IH for 14 or 35 days as compared to normoxic mice (Figure 3). In addition to providing insight into the mechanism by which OSAS increases T-cells proliferation and upregulation of gene expression of inflammatory mediators, our data on the subsequent recruitment of the inflammatory cells from the circulation into the arterial vascular wall, strongly suggest that IH could induce atherosclerosis in mice.

Atherosclerosis is now described as a chronic inflammatory disease and hypercholesterolemia is one of the numerous risk factors that induces atherogenesis (4). Our data show that short-term IH induces a significant increase of total serum cholesterol content as compared with normoxic controls (Figure 4). Moreover, this increase is transient, since cholesterol content returned to basal levels after 35 days of exposure. A recent study support our findings that IH induces hyperlipidemia (23). Thus, exposure of mice to IH for 5 days was reported to increase serum cholesterol and phospholipids levels, upregulate triglycerides and phospholipids biosynthesis pathways, and inhibit pathways of cholesterol uptake in the liver (24). Although the mechanism of the IH-induced hyperlipidemia remains unclear, HDL-cholesterol dysfunction reported in OSAS patients leading to an accumulation of oxidized lipids (24), could explain the increase in cholesterol levels observed in mice in response to IH.

In conclusion, these data suggest that IH by itself can induce an inflammatory response as evidenced by a considerable increase in numerous inflammatory parameters that are also shown to be elevated in atherosclerosis. Thus, inducing inflammation, IH may further induce atherogenesis in mice. Furthermore, our findings not only provide a new insight into the understanding of the pathophysiology of OSAS, but may also allow identifying different processes induced by intermittent hypoxia and further manipulate the intermittent hypoxia-related inflammatory response and subsequent atherosclerosis in OSAS patients.

Acknowledgements

We would like to thank Bruno Chapuis for the conception of the computer program controlling the hypoxic and normoxic cycles; and Dr Elena Pinzar for her constructive critical reading of the manuscript.

References

1. Naegele B, Launois SH, Mazza S, Feuerstein C, Pepin JL, Levy P. Which memory processes are affected in patients with obstructive sleep apnea? An evaluation of 3 types of memory. *Sleep*. 2006;29:533-44.
2. White DP. Sleep apnea. *Proc Am Thor Soc* 2006; 3: 124-128
3. Bergeron C, Kimoff J, Hamid Q. Obstructive sleep apnea syndrome and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:1393-1396.
4. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
5. Li RC, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Fan Q, Brittian KR, Guo SZ, Sachleben LR, Jr., Gozal D. Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:469-75.
6. Row BW, Kheirandish L, Li RC, Guo SZ, Brittian KR, Hardy M, Bazan NG, Gozal D. Platelet-activating factor receptor-deficient mice are protected from experimental sleep apnea-induced learning deficits. *J Neurochem*. 2004;89:189-96.
7. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* 2005; 112: 2660-2667.
8. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, Hirano T, Adachi M. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation*. 2003;107:1129-34.
9. Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, Adachi M. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2004;126:1473-9.
10. Tazaki T, Minoguchi K, Yokoe T, Samson KT, Minoguchi H, Tanaka A, Watanabe Y, Adachi M. Increased levels and activity of matrix metalloproteinase-9 in obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:1354-9.
11. Bounhoure JP, Galinier M, Didier A, Leophonte P. Sleep apnea syndrome and cardiovascular disease. *Bull Acad Natl Med* 2005; 189:445-459.
12. Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol*. 2003;94:179-84.

13. Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, Okada S, Ohta S, Naito H, Adachi M. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:625-30.
14. Beguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Levy P, Ribuot C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol.* 2005;99:1064-9.
15. Veillard NR, Steffens S, Pelli G, Lu B, Kwak BR, Gerard C, Charo IF, Mach F. Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo. *Circulation.* 2005;112:870-8.
16. Johnson Z, Kosco-Vilbois MH, Herren S, Cirillo R, Muzio V, Zaratini P, Carbonatto M, Mack M, Smailbegovic A, Rose M, Lever R, Page C, Wells TN, Proudfoot AE. Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. *J Immunol.* 2004;173:5776-85.
17. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res.* 2004;94:253-61.
18. Veillard NR, Steffens S, Burger F, Pelli G, Mach F. Differential expression patterns of proinflammatory and antiinflammatory mediators during atherogenesis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2339-44.
19. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *N Engl J Med.* 2006;354:508-519.
20. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-21.
21. Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, Gilman SC, Stellato C, Gladue RP, Schleimer RP, Beck LA. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 2000;164:3392-401.
22. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991;67:1033-6.
23. Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, Marino RL, Rodriguez A, Hubbard WC, O'Donnell CP, Polotsky VY. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res.* 2005;97:698-706.
24. Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, Ip MS. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis.* 2005.

Figure legends.

Figure 1. Activation of spleen-derived T-cells proliferation by IH. After exposure of mice for 5, 14 and 35 days to normoxia or IH, T-cells were isolated, stimulated with concanavalin A for 72 hr and the proliferation rate was then determined. Bar graphs represent the average values (mean \pm SEM) of activation of splenocyte proliferation, expressed as a percentage of normoxic control values.

Figure 2. Increase in total mRNA content of inflammatory markers in response to IH exposure. The expression pattern of chemokines RANTES (A), MIP-1 α (B), and MCP-1 (C) was determined by real-time quantitative RT-PCR on spleen tissue using the eukaryotic 18S control. The graph represent mRNA expression in hypoxic controls (white bars) and mice exposed to IH (grey bars). The average values normalized to the control, were calculated from the Ct values (maximal and minimal Ct values are indicated inside the bars of the graph) as described in Methods.

Figure 3. Effect of IH exposure on leukocyte rolling on the endothelial cell layer. After exposure of mice to either normoxia or hypoxia for 5, 14 and 35 day, leukocyte rolling flux was quantified as the number of rolling cells moving past a fixed point on the venular wall per a 30 sec period (ϕ /30 sec). The graph represent the average values (mean \pm SEM) for controls (white bars) and exposed animals (grey bars) .

Figure 4. Increase in total cholesterol level in mice exposed to IH. Bar graph represent the average values (mean \pm SEM) of total cholesterol content measured in serum of mice exposed to normoxia (n=6) (white bars) or hypoxia (n=6) (grey bars) for 0, 5, 14, and 35 days.

Figure 1

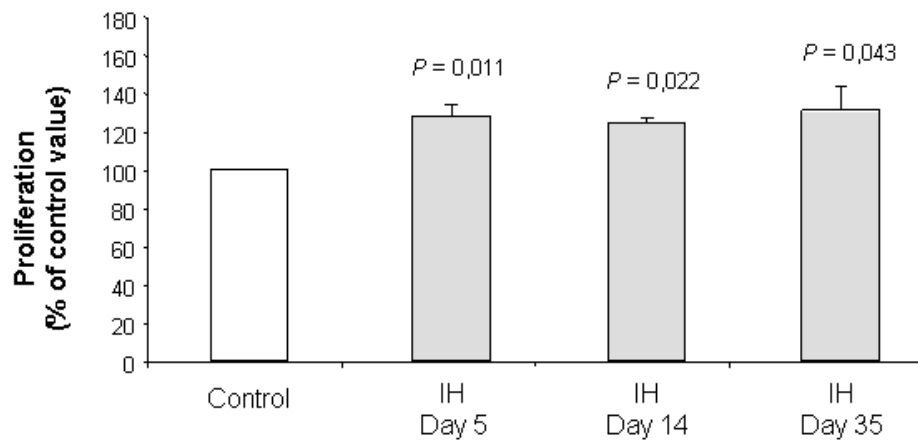


Figure 2

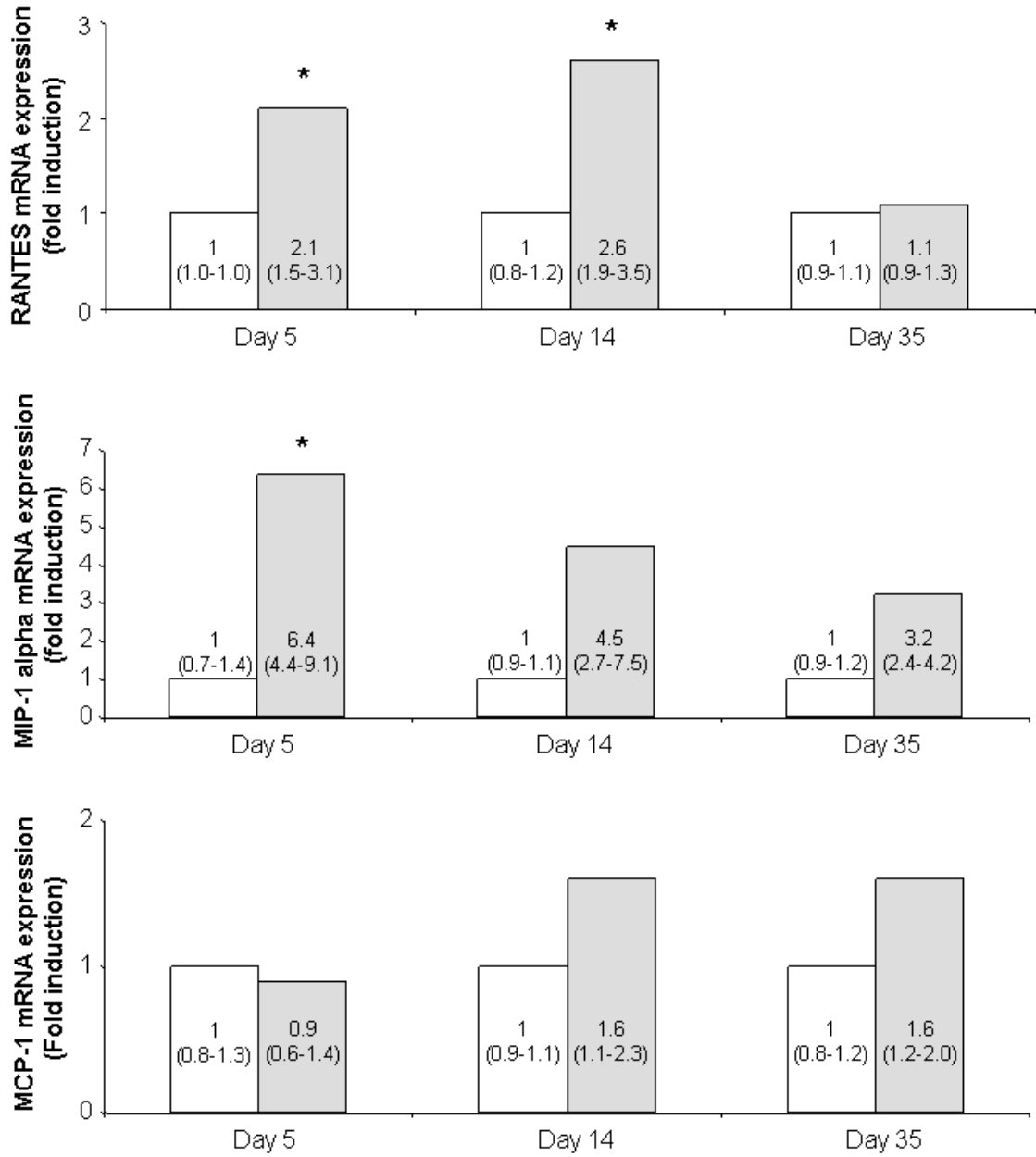


Figure 3

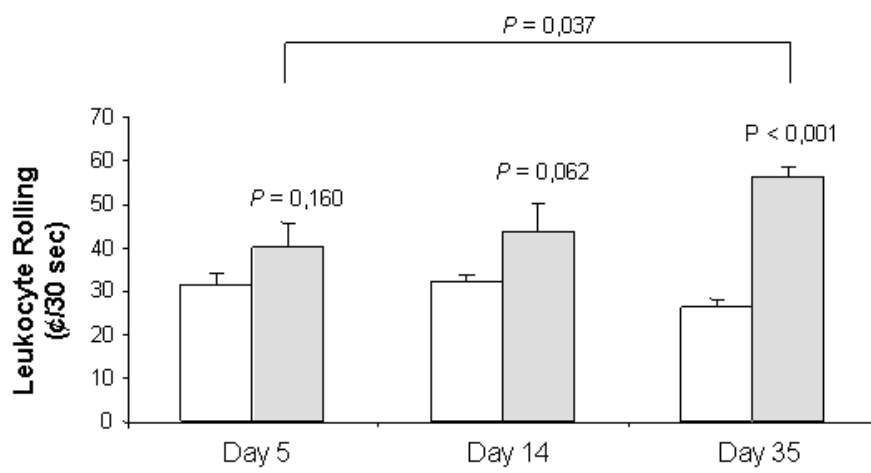
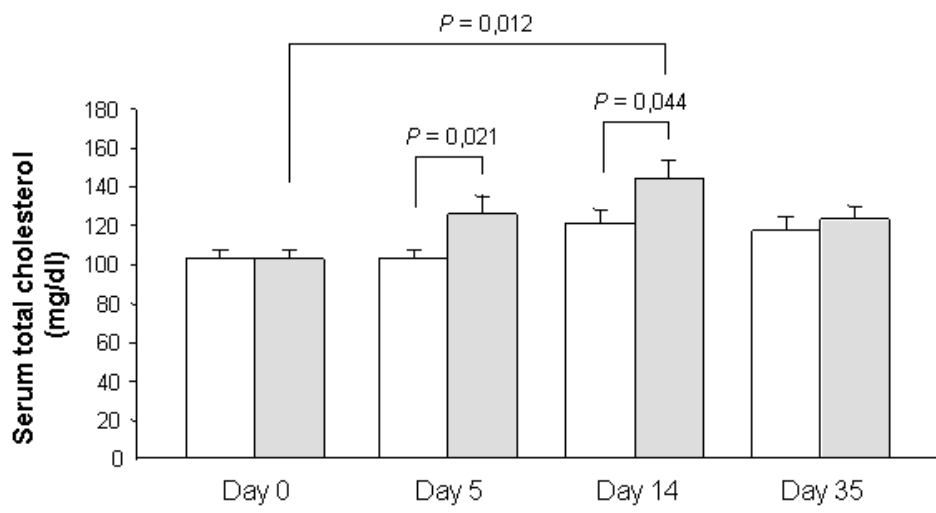


Figure 4



10 Discussion et Perspectives

10.1 Inflammation et HI

Il est maintenant établi que le SAOS est un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires et notamment de l'athérogenèse [183] et que l'inflammation joue un rôle dans les complications dues au SAOS [201].

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur à l'origine du processus d'athérosclérose. Une étude de Li et collaborateurs montrent que l'HI induit une hyperlipidémie chez des souris non obèses après 5 jours d'exposition [204]. Dans la troisième étude de ce manuscrit, nous observons une augmentation du taux de cholestérol sérique après 5 et 14 jours d'exposition à l'HI. Cependant, nous montrons de façon intéressante que cette augmentation est transitoire, puisque après 35 jours d'exposition il n'y a plus de différence entre les souris du groupe normoxique et celles du groupe hypoxique. Le mécanisme de cette hypercholestérolémie induite par l'HI n'est pas très clair et des divergences semblent exister entre les espèces étudiées.

Une hypercholestérolémie se traduit par une augmentation du taux de cholestérol. Ce dysfonctionnement du métabolisme lipidique est lié à la distribution du cholestérol dans les lipoprotéines LDL et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Les LDL transportent le cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Les HDL jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol et des taux plasmatiques élevés de HDL sont associés à une protection contre les maladies cardiovasculaires. Les HDL possèdent un rôle protecteur et des propriétés anti-athérogéniques, d'une part en facilitant l'efflux de cholestérol des cellules et le transport inverse du cholestérol vers le foie, et d'autre part grâce à leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques [205].

Des études cliniques suggèrent que le SAOS est associé à une diminution du HDL cholestérol (HDL-c) [178, 206]. Cependant, Li et collaborateurs observent une augmentation du HDL-c suite à l'HI chez les souris [204]. Ils suggèrent que l'HI modifie les propriétés des lipoprotéines, ce qui conduit à la conversion des HDL anti-athérogènes en facteur pro-

athérogènes. Les patients porteurs du SAOS présentent une modification de la composition protéique des HDL qui se traduit par une perte de la fonction de ces HDL [187]. Celles-ci sont alors incapables de récupérer le cholestérol en excès dans l'organisme afin de le ramener vers le foie, où il est recyclé, et de jouer leur rôle anti-inflammatoire et antioxydant [205]. Cette dysfonction conduit alors à l'accumulation des LDL oxydées. De plus, l'hypoxie augmente l'oxydation des LDL par les macrophages humains [207]. Ces deux études suggèrent qu'il existe bien une composante inflammatoire chez les patients SAOS.

De plus, dans cette troisième étude, nous avons montré, *in vitro*, que l'HI augmente la réponse proliférative des lymphocytes T dérivés de la rate du 5^{ème} au 35^{ème} jour, et qu'elle augmente significativement l'expression des chimiokines RANTES et MIP-1 α . L'expression de MCP-1 tend, quant à elle, à être augmentée mais pas de manière significative. Ces deux résultats montrent que l'HI seule induit une réponse inflammatoire. Les chimiokines sont connues pour induire la migration, la croissance et l'activation des leucocytes et pour réguler le « trafic » des leucocytes pendant l'inflammation. Il a notamment été montré que MIP-1 α attire, au niveau du site de l'inflammation, de nombreux leucocytes et notamment les lymphocytes T [208]. De plus, des anticorps neutralisant MIP-1 α sont capables de diminuer l'inflammation en limitant le recrutement des leucocytes [209]. Il est donc envisageable dans notre modèle que la surexpression de MIP1- α et de RANTES puisse participer au recrutement des leucocytes. Comme la première étape de ce recrutement est le roulement des leucocytes sur l'endothélium et puisque l'HI induit l'expression des chimiokines MIP-1 α et RANTES, nous avons finalement étudié par microscopie intravitale le roulement des leucocytes suite à l'HI. Nous avons observé une augmentation significative du roulement chez les souris exposées à 14 et 35 jours d'HI. Ce résultat suggère fortement que notre modèle d'HI peut induire un processus athérogène chez les souris.

Cette troisième étude nous permet de conclure que l'HI semble être un médiateur important des complications cardiovasculaires et notamment de l'athérogenèse, chez les patients porteurs de SAOS.

10.2 Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans la deuxième partie de ce travail de thèse suggèrent que l'HI seule peut induire une réponse inflammatoire. Notre modèle d'HI chronique est donc très précieux puisqu'il nous permet d'étudier l'effet isolé de l'HI sur le processus d'athérogenèse. Suite à ces résultats préliminaires, des études complémentaires sont envisagées afin de caractériser au mieux la pathologie du SAOS.

Tout d'abord, il est important de mesurer le taux de différentes lipoprotéines (LDL et HDL cholestérol) suite à l'HI chez la souris. Cela nous permettrait peut-être d'expliquer l'hypercholestérolémie que nous avons observée. Si nous trouvons une augmentation des HDL-c suite à l'HI, comme l'équipe de Li, nous pourrions moduler ces HDL-c afin de diminuer l'inflammation chez ces souris. Il est également nécessaire de mesurer la fonction des HDL et le taux de LDL oxydées chez les souris soumises à l'HI. Nous avons montré que l'expression des chimiokines RANTES et MIP-1 α est augmentée suite à l'HI, il semble donc également nécessaire d'étudier l'implication des récepteurs de ces chimiokines (CCR1, 3, 5 pour RANTES et CCR5 pour MIP-1 α) dans notre modèle.

L'athérosclérose est caractérisée comme une pathologie inflammatoire chronique. Les souris ne développent pas d'athérosclérose dans les conditions normales. Comme nous avons montré que des souris normales développent une réponse inflammatoire suite à une HI, il sera important d'évaluer la réponse inflammatoire induite suite à l'HI dans un modèle murin développé pour l'étude de l'athérogenèse. En utilisant des souris génétiquement modifiées qui développent spontanément des plaques d'athérome (souris knock out pour le récepteur aux LDL ou pour l'apolipoprotéine E), nous pourrions tester si la progression du processus inflammatoire, associé à l'athérosclérose, est accélérée par l'HI. Ceci nous permettra dans le futur d'envisager des traitements par les statines ou les antagonistes des récepteurs aux chimiokines. Les statines sont, en effet, considérées comme un traitement de choix dans l'athérosclérose. Elles sont capables d'améliorer le profil lipidique sanguin mais il est largement montré qu'elles ont d'autres effets non liés à la baisse du cholestérol. Il existe donc

des effets annexes, dits pléiotropes, bénéfiques des statines en dehors de leur action hypolipémiante. Il a notamment été observé que les statines diminuent l'inflammation en inhibant le recrutement des leucocytes [210] ou en réduisant la production de protéine C réactive [211], de RANTES ou MCP-1 [212]. Le traitement par antagonisme des récepteurs aux chimiokines est également envisageable. En effet, le traitement de souris déficientes en récepteur au LDL par un antagoniste des récepteurs à la chimiokine RANTES réduit la formation de la plaque d'athérome [213].

Le traitement de référence pour les patients SAOS est la PPC [214]. Elle permet d'atténuer les effets délétères du SAOS et notamment de diminuer l'inflammation [175, 177]. Il semble donc intéressant de voir si le phénotype inflammatoire des souris soumises à l'HI peut être inversé en les réexposant, après l'HI, à la normoxie.

L'évaluation et la caractérisation du phénotype inflammatoire développé suite à l'HI nous permettront de mieux comprendre le lien entre la pathophysiologie du SAOS et l'athérogenèse et notamment de moduler la réponse inflammatoire induite par l'HI dans le SAOS.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Hearse DJ. Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990 Aug; 4 Suppl 4: 767-76.
- [2] Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation.* 1989 Oct; 80(4): 1049-62.
- [3] Fletcher EC. Effect of episodic hypoxia on sympathetic activity and blood pressure. *Respir Physiol.* 2000 Feb; 119(2-3): 189-97.
- [4] Lavie P, Lavie L, Herer P. All-cause mortality in males with sleep apnoea syndrome: declining mortality rates with age. *Eur Respir J.* 2005 Mar; 25(3): 514-20.
- [5] Lavie L, Lavie P. Ischemic preconditioning as a possible explanation for the age decline relative mortality in sleep apnea. *Med Hypotheses.* 2006; 66(6): 1069-73.
- [6] Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation.* 1990 Sep; 82(3): 723-38.
- [7] Opie LH. *The Heart, Physiology, from Cell to Circulation.* 3rd ed: Lippincott-Raven; 1998.
- [8] 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.
- [9] Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res.* 1998 Jan; 37(1): 21-33.
- [10] Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.* 1993 Jun; 72(6): 1293-9.
- [11] Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation.* 1993 Sep; 88(3): 1264-72.
- [12] Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol.* 1986 Dec; 251(6 Pt 2): H1306-15.
- [13] 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.

- [14] Sun JZ, Tang XL, Knowlton AA, Park SW, Qiu Y, Bolli R. Late preconditioning against myocardial stunning. An endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 h after brief ischemia in conscious pigs. *J Clin Invest*. 1995 Jan; 95(1): 388-403.
- [15] Carroll R, Yellon DM. Delayed cardioprotection in a human cardiomyocyte-derived cell line: the role of adenosine, p38MAP kinase and mitochondrial KATP. *Basic Res Cardiol*. 2000 Jun; 95(3): 243-9.
- [16] Kaeffer N, Richard V, Thuillez C. Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals. *Circulation*. 1997 Oct 7; 96(7): 2311-6.
- [17] Stein AB, Tang XL, Guo Y, Xuan YT, Dawn B, Bolli R. Delayed adaptation of the heart to stress: late preconditioning. *Stroke*. 2004 Nov; 35(11 Suppl 1): 2676-9.
- [18] Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, et al. Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr; 86(7): 2516-20.
- [19] Brown JM, Anderson BO, Repine JE, Shanley PF, White CW, Grosso MA, et al. Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1992 May; 24(5): 485-95.
- [20] Tang XL, Takano H, Rizvi A, Turrens JF, Qiu Y, Wu WJ, et al. Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jan; 282(1): H281-91.
- [21] Takano H, Bolli R, Black RG, Jr., Kodani E, Tang XL, Yang Z, et al. A(1) or A(3) adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res*. 2001 Mar 16; 88(5): 520-8.
- [22] Takano H, Tang XL, Qiu Y, Guo Y, French BA, Bolli R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res*. 1998 Jul 13; 83(1): 73-84.
- [23] Kevelaitis E, Oubenaissa A, Peynet J, Mouas C, Menasche P. Preconditioning by mitochondrial ATP-sensitive potassium channel openers: An effective approach for

improving the preservation of heart transplants. *Circulation*. 1999 Nov 9; 100(19 Suppl): II345-50.

[24] Fryer RM, Hsu AK, Eells JT, Nagase H, Gross GJ. Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of mitochondrial KATP channels. *Circ Res*. 1999 Apr 16; 84(7): 846-51.

[25] Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res*. 2000 Nov 24; 87(11): 972-83.

[26] Karliner JS, Honbo N, Epstein CJ, Xian M, Lau YF, Gray MO. Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Oct; 32(10): 1779-86.

[27] Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Kisin E, Kagan VE, et al. Hypoxic preconditioning preserves antioxidant reserve in the working rat heart. *Cardiovasc Res*. 1995; 29(1): 133-40.

[28] Ladilov Y, Maxeiner H, Wolf C, Schafer C, Meuter K, Piper HM. Role of protein phosphatases in hypoxic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283(3): H1092-8.

[29] Xi L, Tekin D, Gursoy E, Salloum F, Levasseur JE, Kukreja RC. Evidence that NOS2 acts as a trigger and mediator of late preconditioning induced by acute systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283(1): H5-12.

[30] Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003 Jul 8; 108(1): 79-85.

[31] Kerwin JF, Jr., Lancaster JR, Jr., Feldman PL. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem*. 1995 Oct 27; 38(22): 4343-62.

[32] Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y, et al. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res*. 1997 Jul; 81(1): 42-52.

[33] Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikalapudi S, Takano H, Jadoon AK, et al. Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol*. 1997 Dec; 273(6 Pt 2): H2931-6.

- [34] Hill M, Takano H, Tang XL, Kodani E, Shirk G, Bolli R. Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits despite development of nitrate tolerance. *Circulation*. 2001 Aug 7; 104(6): 694-9.
- [35] Tang XL, Kodani E, Takano H, Hill M, Shinmura K, Vondriska TM, et al. Protein tyrosine kinase signaling is necessary for NO donor-induced late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Apr; 284(4): H1441-8.
- [36] Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1991 Mar; 5 Suppl 2: 249-68.
- [37] Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 15; 61(3): 461-70.
- [38] Takeshima S, Vaage J, Valen G. Can reactive oxygen species precondition the isolated rat heart against arrhythmias and stunning? *Acta Physiol Scand*. 1997 Nov; 161(3): 263-70.
- [39] Sun JZ, Tang XL, Park SW, Qiu Y, Turrens JF, Bolli R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J Clin Invest*. 1996 Jan 15; 97(2): 562-76.
- [40] Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jan; 29(1): 207-16.
- [41] Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30(6): 1181-9.
- [42] Arnaud C, Joyeux M, Garrel C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Ribuot C. Free-radical production triggered by hyperthermia contributes to heat stress-induced cardioprotection in isolated rat hearts. *Br J Pharmacol*. 2002; 135(7): 1776-82.
- [43] Martin WR. Opioid antagonists. *Pharmacol Rev*. 1967 Dec; 19(4): 463-521.
- [44] Barron BA, Jones CE, Caffrey JL. Pericardial repair depresses canine cardiac catecholamines and met-enkephalin. *Regul Pept*. 1995 Nov 10; 59(3): 313-20.
- [45] Eliasson T, Mannheimer C, Waagstein F, Andersson B, Bergh CH, Augustinsson LE, et al. Myocardial turnover of endogenous opioids and calcitonin-gene-related peptide in the

human heart and the effects of spinal cord stimulation on pacing-induced angina pectoris. *Cardiology*. 1998 Mar; 89(3): 170-7.

[46] McLaughlin PJ, Wu Y. Opioid gene expression in the developing and adult rat heart. *Dev Dyn*. 1998 Feb; 211(2): 153-63.

[47] Wu S, Li HY, Wong TM. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte. Involvement of kappa-opioid receptor. *Circ Res*. 1999 Jun 25; 84(12): 1388-95.

[48] Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol*. 1995 May; 115(2): 222-4.

[49] Baxter GF, Mocanu MM, Yellon DM. Attenuation of myocardial ischaemic injury 24 h after diacylglycerol treatment in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Jul; 29(7): 1967-75.

[50] Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res*. 1997 Sep; 81(3): 404-14.

[51] Qiu Y, Ping P, Tang XL, Manchikalapudi S, Rizvi A, Zhang J, et al. Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that epsilon is the isoform involved. *J Clin Invest*. 1998 May 15; 101(10): 2182-98.

[52] Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL, Qiu Y, Li RC, et al. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning. *Circ Res*. 1999 Mar 19; 84(5): 587-604.

[53] Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem*. 1996 Nov 29; 271(48): 30835-9.

[54] Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res*. 2000 Aug 18; 87(4): 309-15.

- [55] Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Second window of protection following myocardial preconditioning: an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Sep; 35(9): 1063-71.
- [56] Michel MC, Li Y, Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2001 Mar; 363(3): 245-66.
- [57] da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology.* 2004 Jan; 100(1): 59-69.
- [58] Marais E, Genade S, Strijdom H, Moolman JA, Lochner A. p38 MAPK activation triggers pharmacologically-induced beta-adrenergic preconditioning, but not ischaemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Dec; 33(12): 2157-77.
- [59] Haq SE, Clerk A, Sugden PH. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by adenosine in the perfused rat heart. *FEBS Lett.* 1998 Sep 4; 434(3): 305-8.
- [60] Reid EA, Kristo G, Yoshimura Y, Ballard-Croft C, Keith BJ, Mentzer RM, Jr., et al. In vivo adenosine receptor preconditioning reduces myocardial infarct size via subcellular ERK signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 May; 288(5): H2253-9.
- [61] Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. ERK and p38 MAP kinase activation are components of opioid-induced delayed cardioprotection. *Basic Res Cardiol.* 2001 Apr; 96(2): 136-42.
- [62] Rizvi A, Tang XL, Qiu Y, Xuan YT, Takano H, Jadoon AK, et al. Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol.* 1999 Sep; 277(3 Pt 2): H874-84.
- [63] Tang XL, Qiu Y, Park SW, Sun JZ, Kalya A, Bolli R. Time course of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *Circ Res.* 1996 Sep; 79(3): 424-34.
- [64] Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, et al. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res.* 1997 Dec; 81(6): 1094-107.

- [65] Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF. Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br J Pharmacol*. 1999; 126(3): 701-8.
- [66] Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28; 96(20): 11507-12.
- [67] Wang Y, Guo Y, Zhang SX, Wu WJ, Wang J, Bao W, et al. Ischemic preconditioning upregulates inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Jan; 34(1): 5-15.
- [68] Kodani E, Xuan YT, Takano H, Shinmura K, Tang XL, Bolli R. Role of cyclic guanosine monophosphate in late preconditioning in conscious rabbits. *Circulation*. 2002 Jun 25; 105(25): 3046-52.
- [69] Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y, et al. Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 2002 Mar 22; 90(5): 602-8.
- [70] Gross GJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep; 285(3): H921-30.
- [71] Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. 1992 Feb; 70(2): 223-33.
- [72] Cole WC, McPherson CD, Sontag D. ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res*. 1991 Sep; 69(3): 571-81.
- [73] Hamada K, Yamazaki J, Nagao T. Shortening of action potential duration is not prerequisite for cardiac protection by ischemic preconditioning or a KATP channel opener. *J Mol Cell Cardiol*. 1998 Jul; 30(7): 1369-79.
- [74] Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS, Darbenzio RB. Cardioprotection with the KATP opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995 Jul; 26(1): 145-52.
- [75] Yao Z, Gross GJ. Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation*. 1994 Apr; 89(4): 1769-75.

- [76] Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*. 1991 Jul 18; 352(6332): 244-7.
- [77] Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. 1997 Dec; 81(6): 1072-82.
- [78] Mei DA, Elliott GT, Gross GJ. KATP channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A. *Am J Physiol*. 1996 Dec; 271(6 Pt 2): H2723-9.
- [79] Garlid KD. Cation transport in mitochondria--the potassium cycle. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jul 18; 1275(1-2): 123-6.
- [80] Szewczyk A, Mikolajek B, Pikula S, Nalecz MJ. Potassium channel openers induce mitochondrial matrix volume changes via activation of ATP-sensitive K⁺ channel. *Pol J Pharmacol*. 1993 Jul-Aug; 45(4): 437-43.
- [81] Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*. 1999 Sep 1; 519 Pt 2: 347-60.
- [82] Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, West IC, Jaburek M, Garlid KD. The direct physiological effects of mitoK(ATP) opening on heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan; 290(1): H406-15.
- [83] Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*. 2003 Jun 1; 549(Pt 2): 513-24.
- [84] Light P. Regulation of ATP-sensitive potassium channels by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1996 May 6; 1286(1): 65-73.
- [85] Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, Walsh MP, French RJ. Molecular basis of protein kinase C-induced activation of ATP-sensitive potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 1; 97(16): 9058-63.
- [86] Brooks G, Hearse DJ. Role of protein kinase C in ischemic preconditioning: player or spectator? *Circ Res*. 1996 Sep; 79(3): 627-30.
- [87] Sato T, O'Rourke B, Marban E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels by protein kinase C. *Circ Res*. 1998 Jul 13; 83(1): 110-4.

- [88] Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988 Jul; 22(7): 447-55.
- [89] Yoshida K, Mizukami Y, Kitakaze M. Nitric oxide mediates protein kinase C isoform translocation in rat heart during postischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Feb 24; 1453(2): 230-8.
- [90] Joyeux M, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the rat isolated heart. *Br J Pharmacol.* 1998 Mar; 123(6): 1085-8.
- [91] Shi Y, Rafiee P, Su J, Pritchard KA, Jr., Tweddell JS, Baker JE. Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol.* 2004 May; 99(3): 173-82.
- [92] Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Yang WW, Yang HT, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin.* 2005 Mar; 26(3): 315-22.
- [93] 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.
- [94] Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Auchampach JA, Gross GJ. Extending the cardioprotective window using a novel delta-opioid agonist fentanyl isothiocyanate via the PI3-kinase pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jun; 288(6): H2744-9.
- [95] Arnaud C, Joyeux-Faure M, Bottari S, Godin-Ribuot D, Ribuot C. New insight into the signalling pathways of heat stress-induced myocardial preconditioning: protein kinase Cepsilon translocation and heat shock protein 27 phosphorylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 Mar; 31(3): 129-33.
- [96] Lasley RD, Keith BJ, Kristo G, Yoshimura Y, Mentzer RM, Jr. Delayed adenosine A1 receptor preconditioning in rat myocardium is MAPK dependent but iNOS independent. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug; 289(2): H785-91.
- [97] Neubauer JA. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol.* 2001 Apr; 90(4): 1593-9.

- [98] Sasaki H, Ray PS, Zhu L, Otani H, Asahara T, Maulik N. Hypoxia/reoxygenation promotes myocardial angiogenesis via an NF kappa B-dependent mechanism in a rat model of chronic myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Feb; 33(2): 283-94.
- [99] Lasley RD, Anderson GM, Mentzer RM, Jr. Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 1993 Apr; 27(4): 565-70.
- [100] Baumgarten KM, Gerstenblith G, Weiss RG. High extracellular K⁺ during hypoxic preconditioning episodes attenuates the post-ischemic contractile and ionic benefits of preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Jan; 31(1): 203-13.
- [101] Kuwahara K, Saito Y, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada M, Ogawa E, et al. Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Aug; 32(8): 1385-94.
- [102] Brar BK, Stephanou A, Knight R, Latchman DS. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Apr; 34(4): 483-92.
- [103] Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation.* 2000 Feb 15; 101(6): 660-7.
- [104] Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, et al. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation.* 2001 Jul 17; 104(3): 330-5.
- [105] Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res.* 1998 Aug 24; 83(4): 345-52.
- [106] Xu W, Liu Y, Wang S, McDonald T, Van Eyk JE, Sidor A, et al. Cytoprotective role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* 2002 Nov 1; 298(5595): 1029-33.
- [107] Sasaki H, Fukuda S, Otani H, Zhu L, Yamaura G, Engelman RM, et al. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile

functional reserve in rat with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2002 Mar; 34(3): 335-48.

[108] Kevin LG, Novalija E, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg.* 2005 Nov; 101(5): 1275-87.

[109] Gong KZ, Zhang ZG, Li AH, Huang YF, Bu P, Dong F, et al. ROS-mediated ERK activation in delayed protection from anoxic preconditioning in neonatal rat cardiomyocytes. *Chin Med J (Engl).* 2004 Mar; 117(3): 395-400.

[110] Shi Y, Hutchins WC, Su J, Siker D, Hogg N, Pritchard KA, Jr., et al. Delayed cardioprotection with isoflurane: role of reactive oxygen and nitrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jan; 288(1): H175-84.

[111] Nakano A, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Ther.* 2000 Jun; 86(3): 263-75.

[112] Takeshima S, Vaage J, Valen G. Preconditioning the globally ischaemic, isolated rat heart: the impact of the preconditioning model on post-ischaemic systolic and diastolic function. *Scand J Clin Lab Invest.* 1997 Nov; 57(7): 637-46.

[113] Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, Iimura O. Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning? *Circulation.* 1991 Dec; 84(6): 2504-12.

[114] Joyeux-Faure M, Stanke-Labesque F, Lefebvre B, Beguin P, Godin-Ribuot D, Ribuot C, et al. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J Appl Physiol.* 2005 May; 98(5): 1691-6.

[115] Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15; 61(3): 427-36.

[116] Joyeux M, Boumendjel A, Carroll R, Ribuot C, Godin-Ribuot D, Yellon DM. SB 203580, a mitogen-activated protein kinase inhibitor, abolishes resistance to myocardial infarction induced by heat stress. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2000 Jun; 14(3): 337-43.

[117] Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Jun; 282(6): L1324-9.

- [118] Zheng M, Reynolds C, Jo SH, Wersto R, Han Q, Xiao RP. Intracellular acidosis-activated p38 MAPK signaling and its essential role in cardiomyocyte hypoxic injury. *Faseb J*. 2005 Jan; 19(1): 109-11.
- [119] Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism. *Circ Res*. 2000 May 12; 86(9): 989-97.
- [120] Clerk A, Sugden PH. The p38-MAPK inhibitor, SB203580, inhibits cardiac stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases (SAPKs/JNKs). *FEBS Lett*. 1998 Apr 10; 426(1): 93-6.
- [121] Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *Faseb J*. 2000 Nov; 14(14): 2237-46.
- [122] Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, et al. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. *Circ Res*. 2003 Aug 8; 93(3): 254-61.
- [123] Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Feb; 296(2): 642-9.
- [124] Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, et al. 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.
- [125] Liu X, Wu X, Cai L, Tang C, Su J. Hypoxic preconditioning of cardiomyocytes and cardioprotection: phosphorylation of HIF-1alpha induced by p42/p44 mitogen-activated protein kinases is involved. *Pathophysiology*. 2003 Sep; 9(4): 201-5.
- [126] Zhang JP, Huang YS, Yang ZC. [Role of mitogen - activated protein kinases signal pathway in cardiomyocyte injury induced by serum after hypoxia and burn injury]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2005 Mar; 17(3): 150-3.

- [127] Germack R, Dickenson JM. Adenosine triggers preconditioning through MEK/ERK1/2 signalling pathway during hypoxia/reoxygenation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Sep; 39(3): 429-42.
- [128] Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Tsai BM, Morrell ED, Meldrum DR. Preconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials. *J Am Coll Surg.* 2006 May; 202(5): 797-812.
- [129] Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, Giaccia AJ. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* 2001 Mar 15; 61(6): 2429-33.
- [130] Wang Y, Ahmad N, Kudo M, Ashraf M. Contribution of Akt and endothelial nitric oxide synthase to diazoxide-induced late preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Sep; 287(3): H1125-31.
- [131] Qin Q, Downey JM, Cohen MV. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Feb; 284(2): H727-34.
- [132] Uchiyama Y, Otani H, Okada T, Uchiyama T, Ninomiya H, Kido M, et al. Integrated pharmacological preconditioning in combination with adenosine, a mitochondrial KATP channel opener and a nitric oxide donor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Jul; 126(1): 148-59.
- [133] Yu R, Mandlekar S, Tan TH, Kong AN. Activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways and induction of apoptosis by chelerythrine do not require inhibition of protein kinase C. *J Biol Chem.* 2000 Mar 31; 275(13): 9612-9.
- [134] Balafanova Z, Bolli R, Zhang J, Zheng Y, Pass JM, Bhatnagar A, et al. Nitric oxide induces nitration of PKCepsilon, facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon -RACK2 interactions: A novel mechanism of NO-triggered activation of PKCepsilon. *J Biol Chem.* 2002; 277: 11.
- [135] Hu K, Duan D, Li GR, Nattel S. Protein kinase C activates ATP-sensitive K⁺ current in human and rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 1996 Mar; 78(3): 492-8.
- [136] Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Nov; 33(11): 1897-918.

- [137] Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, et al. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 1998 Oct; 93(5): 325-38.
- [138] Przyklenk K, Sussman MA, Simkhovich BZ, Kloner RA. Does ischemic preconditioning trigger translocation of protein kinase C in the canine model? *Circulation*. 1995 Sep 15; 92(6): 1546-57.
- [139] Yang XM, Sato H, Downey JM, Cohen MV. Protection of ischemic preconditioning is dependent upon a critical timing sequence of protein kinase C activation. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Mar; 29(3): 991-9.
- [140] Takano H, Tang XL, Bolli R. Differential role of K(ATP) channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Nov; 279(5): H2350-9.
- [141] Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Ding HL, Zhou ZN. ATP-dependent potassium channels involved in the cardiac protection induced by intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Life Sci*. 2003 Jul 25; 73(10): 1275-87.
- [142] Baker JE, Contney SJ, Gross GJ, Bosnjak ZJ. KATP channel activation in a rabbit model of chronic myocardial hypoxia. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Feb; 29(2): 845-8.
- [143] Beguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Levy P, Ribuot C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *J Appl Physiol*. 2005 Sep; 99(3): 1064-9.
- [144] Arnaud C, Godin-Ribuot D, Bottari S, Peinnequin A, Joyeux M, Demenge P, et al. iNOS is a mediator of the heat stress-induced preconditioning against myocardial infarction in vivo in the rat. *Cardiovasc Res*. 2003 Apr 1; 58(1): 118-25.
- [145] Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Inoue M, et al. Increased release of NO during ischemia reduces myocardial contractility and improves metabolic dysfunction. *Circulation*. 1996 Jan 15; 93(2): 356-64.
- [146] Pabla R, Curtis MJ. Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 Oct; 28(10): 2111-21.
- [147] Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Jan; 40(1): 16-23.

- [148] Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2000 Feb 18; 86(3): 319-25.
- [149] Kitakaze M, Node K, Komamura K, Minamino T, Inoue M, Hori M, et al. Evidence for nitric oxide generation in the cardiomyocytes: its augmentation by hypoxia. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Oct; 27(10): 2149-54.
- [150] Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med*. 2000 May 11; 342(19): 1378-84.
- [151] Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Javier Nieto F, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jan; 163(1): 19-25.
- [152] Minoguchi K, Yokoe T, Tazaki T, Minoguchi H, Tanaka A, Oda N, et al. Increased carotid intima-media thickness and serum inflammatory markers in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 1; 172(5): 625-30.
- [153] Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *Jama*. 2000 Apr 12; 283(14): 1829-36.
- [154] Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 1; 165(9): 1217-39.
- [155] Lavie P, Herer P, Hoffstein V. Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study. *Bmj*. 2000 Feb 19; 320(7233): 479-82.
- [156] Becker HF, Jerrentrup A, Ploch T, Grote L, Penzel T, Sullivan CE, et al. Effect of nasal continuous positive airway pressure treatment on blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2003 Jan 7; 107(1): 68-73.
- [157] Pepperell JC, Ramdassingh-Dow S, Crosthwaite N, Mullins R, Jenkinson C, Stradling JR, et al. Ambulatory blood pressure after therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised parallel trial. *Lancet*. 2002 Jan 19; 359(9302): 204-10.

- [158] Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest*. 1997 Jan 1; 99(1): 106-9.
- [159] Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension*. 1992 Jun; 19(6 Pt 1): 555-61.
- [160] Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol*. 1999 Jan; 86(1): 298-305.
- [161] Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, 3rd, Stauss H, Unger T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol*. 1992 May; 72(5): 1978-84.
- [162] Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens*. 1997 Dec; 15(12 Pt 2): 1593-603.
- [163] Smith R, Veale D, Pepin JL, Levy P. [Autonomic nervous system and obstructive sleep apneas]. *Rev Mal Respir*. 1999 Jun; 16(3): 287-304.
- [164] Brooks D, Horner RL, Floras JS, Kozar LF, Render-Teixeira CL, Phillipson EA. Baroreflex control of heart rate in a canine model of obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Apr; 159(4 Pt 1): 1293-7.
- [165] Koskenvuo M, Kaprio J, Partinen M, Langinvainio H, Sarna S, Heikkila K. Snoring as a risk factor for hypertension and angina pectoris. *Lancet*. 1985 Apr 20; 1(8434): 893-6.
- [166] Peker Y, Hedner J, Kraiczi H, Loth S. Respiratory disturbance index: an independent predictor of mortality in coronary artery disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Jul; 162(1): 81-6.
- [167] Young T, Peppard P. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: epidemiologic evidence for a relationship. *Sleep*. 2000 Jun 15; 23 Suppl 4: S122-6.
- [168] Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 2005 Mar 19-25; 365(9464): 1046-53.

- [169] Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *Jama*. 2003 Oct 8; 290(14): 1906-14.
- [170] Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003 Jan 28; 107(3): 391-7.
- [171] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21; 352(16): 1685-95.
- [172] Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Hopper K, Lotsikas A, Lin HM, et al. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Mar; 85(3): 1151-8.
- [173] Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 May; 82(5): 1313-6.
- [174] Mills PJ, Dimsdale JE. Sleep apnea: a model for studying cytokines, sleep, and sleep disruption. *Brain Behav Immun*. 2004 Jul; 18(4): 298-303.
- [175] Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. Effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8, and MCP-1. *J Appl Physiol*. 2003 Jan; 94(1): 179-84.
- [176] Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso V, et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2002 May 28; 105(21): 2462-4.
- [177] Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation*. 2003 Mar 4; 107(8): 1129-34.
- [178] Chin K, Nakamura T, Shimizu K, Mishima M, Nakamura T, Miyasaka M, et al. Effects of nasal continuous positive airway pressure on soluble cell adhesion molecules in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Am J Med*. 2000 Nov; 109(7): 562-7.
- [179] Ohga E, Nagase T, Tomita T, Teramoto S, Matsuse T, Katayama H, et al. Increased levels of circulating ICAM-1, VCAM-1, and L-selectin in obstructive sleep apnea syndrome. *J Appl Physiol*. 1999 Jul; 87(1): 10-4.

- [180] Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Apr 1; 165(7): 934-9.
- [181] Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1998 Sep; 25(4-5): 404-33.
- [182] Walzog B, Gaehtgens P. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol Sci.* 2000 Jun; 15: 107-13.
- [183] Baguet JP, Hammer L, Levy P, Pierre H, Launois S, Mallion JM, et al. The severity of oxygen desaturation is predictive of carotid wall thickening and plaque occurrence. *Chest.* 2005 Nov; 128(5): 3407-12.
- [184] Carpagnano GE, Kharitonov SA, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane and interleukin-6 in breath condensate of obstructive sleep apnea patients. *Chest.* 2002 Oct; 122(4): 1162-7.
- [185] Barcelo A, Miralles C, Barbe F, Vila M, Pons S, Agusti AG. Abnormal lipid peroxidation in patients with sleep apnoea. *Eur Respir J.* 2000 Oct; 16(4): 644-7.
- [186] Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2004 Feb 1; 27(1): 123-8.
- [187] Tan KC, Chow WS, Lam JC, Lam B, Wong WK, Tam S, et al. HDL dysfunction in obstructive sleep apnea. *Atherosclerosis.* 2006 Feb; 184(2): 377-82.
- [188] Schulz R, Mahmoudi S, Hattar K, Sibelius U, Olschewski H, Mayer K, et al. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. Impact of continuous positive airway pressure therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug; 162(2 Pt 1): 566-70.
- [189] Row BW, Liu R, Xu W, Kheirandish L, Gozal D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 1; 167(11): 1548-53.
- [190] Xu W, Chi L, Row BW, Xu R, Ke Y, Xu B, et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. *Neuroscience.* 2004; 126(2): 313-23.

- [191] Chen L, Einbinder E, Zhang Q, Hasday J, Balke CW, Scharf SM. Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Oct 1; 172(7): 915-20.
- [192] Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*. 2006 May 15; 40(10): 1683-92.
- [193] Farre R, Rotger M, Montserrat JM, Calero G, Navajas D. Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 Jul 16; 136(2-3): 199-209.
- [194] Campen MJ, Shimoda LA, O'Donnell CP. Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol*. 2005 Nov; 99(5): 2028-35.
- [195] Greenberg H, Ye X, Wilson D, Htoo AK, Hendersen T, Liu SF. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May 5; 343(2): 591-6.
- [196] Fletcher EC. Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol*. 2001 Apr; 90(4): 1600-5.
- [197] Kraiczi H, Magga J, Sun XY, Ruskoaho H, Zhao X, Hedner J. Hypoxic pressor response, cardiac size, and natriuretic peptides are modified by long-term intermittent hypoxia. *J Appl Physiol*. 1999 Dec; 87(6): 2025-31.
- [198] Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension*. 2001 Feb; 37(2 Part 2): 511-5.
- [199] Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*. 2003 Feb; 7(1): 35-51.
- [200] Young T, Blustein J, Finn L, Palta M. Sleep-disordered breathing and motor vehicle accidents in a population-based sample of employed adults. *Sleep*. 1997 Aug; 20(8): 608-13.
- [201] Bergeron C, Kimoff J, Hamid Q. Obstructive sleep apnea syndrome and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Dec; 116(6): 1393-6.
- [202] Minoguchi K, Tazaki T, Yokoe T, Minoguchi H, Watanabe Y, Yamamoto M, et al. Elevated production of tumor necrosis factor-alpha by monocytes in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Chest*. 2004 Nov; 126(5): 1473-9.

- [203] Li RC, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Fan Q, Brittan KR, et al. Cyclooxygenase 2 and intermittent hypoxia-induced spatial deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 15; 168(4): 469-75.
- [204] Li J, Thorne LN, Punjabi NM, Sun CK, Schwartz AR, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice. *Circ Res*. 2005 Sep 30; 97(7): 698-706.
- [205] Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 15; 46(10): 1792-8.
- [206] Newman AB, Nieto FJ, Guidry U, Lind BK, Redline S, Pickering TG, et al. Relation of sleep-disordered breathing to cardiovascular disease risk factors: the Sleep Heart Health Study. *Am J Epidemiol*. 2001 Jul 1; 154(1): 50-9.
- [207] Rydberg EK, Krettek A, Ullstrom C, Ekstrom K, Svensson PA, Carlsson LM, et al. Hypoxia increases LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Nov; 24(11): 2040-5.
- [208] Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science*. 1993 Apr 16; 260(5106): 355-8.
- [209] Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 2000; 164(6): 3392-401.
- [210] Kwak BR, Mach F. Statins inhibit leukocyte recruitment: new evidence for their anti-inflammatory properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Aug; 21(8): 1256-8.
- [211] Arnaud C, Burger F, Steffens S, Veillard NR, Nguyen TH, Trono D, et al. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jun; 25(6): 1231-6.
- [212] Shimizu K, Aikawa M, Takayama K, Libby P, Mitchell RN. Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. *Circulation*. 2003 Oct 28; 108(17): 2113-20.

[213] Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res.* 2004 Feb 6; 94(2): 253-61.

[214] Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet.* 1981 Apr 18; 1(8225): 862-5.