



HAL
open science

Physiopathologie du cœur embryonnaire soumis à l'anoxie-réoxygénation: Rôle protecteur du NO et des canaux KATP.

Alexandre Sarre

► **To cite this version:**

Alexandre Sarre. Physiopathologie du cœur embryonnaire soumis à l'anoxie-réoxygénation: Rôle protecteur du NO et des canaux KATP.. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lausanne, 2006. Français. NNT: . tel-00268858v1

HAL Id: tel-00268858

<https://theses.hal.science/tel-00268858v1>

Submitted on 1 Apr 2008 (v1), last revised 1 Apr 2008 (v2)

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.

Département de Physiologie

**Physiopathologie du cœur embryonnaire
soumis à l'anoxie-réoxygénation :
Rôle protecteur du NO et des canaux K_{ATP}**

THÈSE DE DOCTORAT ES SCIENCES DE LA VIE (PhD)

présentée à la

Faculté de Biologie et de Médecine de l'Université de Lausanne

Par

Alexandre Sarre

Diplômé en Pharmacologie et Pharmacochimie
Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Jury

Prof. Pierre Goloubinoff, Rapporteur
PD, Dr. Eric Raddatz PhD, Directeur de thèse
Prof. Luc Rochette, Expert
Prof. Maurice Beghetti, Expert

LAUSANNE

2006

Département de Physiologie

**Physiopathologie du cœur embryonnaire
soumis à l'anoxie-réoxygénation :
Rôle protecteur du NO et des canaux K_{ATP}**

THÈSE DE DOCTORAT ES SCIENCES DE LA VIE (PhD)

présentée à la

Faculté de Biologie et de Médecine de l'Université de Lausanne

Par

Alexandre Sarre

Diplômé en Pharmacologie et Pharmacochimie
Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Jury

Prof. Pierre Goloubinoff, Rapporteur
PD, Dr. Eric Raddatz PhD, Directeur de thèse
Prof. Luc Rochette, Expert
Prof. Maurice Beghetti, Expert

LAUSANNE

2006

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

<i>Président</i>	Monsieur Prof. Pierre Goloubinoff
<i>Directeur de thèse</i>	Monsieur Dr Eric Raddatz
<i>Rapporteur</i>	Madame Prof. Pierre Goloubinoff
<i>Experts</i>	Monsieur Prof. Luc Rochette
	Monsieur Dr Maurice Beghetti

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Monsieur Alexandre Sarre

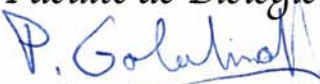
Titulaire d'un DEA en pharmacologie de l'Université de Strasbourg

intitulée

**Physiopathologie du coeur embryonnaire
soumis à l'anoxie-réoxygénation:
Rôle Protecteur du NO et des canaux K_{ATP}**

Lausanne, le 20 janvier 2006

pour Le Doyen
de la Faculté de Biologie et de Médecine


Prof. Pierre Goloubinoff

Remerciements :

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr Eric Raddatz de m'avoir chaleureusement accueilli dans son laboratoire et du temps qu'il a consacré à ce projet. Je tiens également à le remercier de m'avoir si souvent incité à diffuser mon travail. Ceci m'a permis de rencontrer de nombreux spécialistes durant les multiples congrès et conférences. Enfin je tiens à le remercier d'avoir toujours été si disponible et de m'avoir toujours encouragé dans mon travail.

Je tiens également à remercier le Professeur Luc Rochette et le Professeur Maurice Beghetti d'avoir accepté de juger mon travail. Connaissant leurs compétences scientifiques, je suis heureux de pouvoir bénéficier de leurs critiques.

Je remercie aussi le Professeur Goloubinoff d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie le Dr. Christophe Bonni de m'avoir si gentiment accueilli dans son laboratoire pour réaliser une partie de ce travail. Je remercie aussi Fabienne et toute l'équipe pour leur disponibilité et leur gentillesse durant les expériences que j'ai effectuées dans leurs locaux.

Merci aussi au Professeur Pavel Kucera de ses conseils avisés durant tout mon travail et de ses encouragements.

Je remercie Norbert Lange de m'avoir permis d'avoir rapidement un système de mesure de fluorescence opérationnel et de sa disponibilité lors de problèmes techniques.

Un sincère merci à Christian Härberli pour ses réparations express et pour le développement si rapide et efficace des amplificateurs qui ont permis ce travail. Son assistance a toujours été très précieuse, et on peut être sûr qu'il a toujours la réponse à notre problème. A condition de ne pas faire partie du problème...

Je souhaite également remercier Michel Jadé et André Singy pour leurs compétences et leur disponibilité. Un merci tout particulier à André pour l'amélioration significative apportée aux électrodes de mesure de l'ECG. Sans elles, ce travail ne se serait probablement pas aussi bien déroulé.

Merci Anne-Catherine Thomas pour son assistance, ses compétences techniques et les nombreuses expériences réalisées au laboratoire.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'institut avec qui j'ai pu discuter et qui ont pu m'apporter leurs conseils précieux.

Un merci tout particulier à John, qui, le temps qu'il a séjourné à Lausanne, m'a permis d'améliorer mon anglais, et m'a aidé pour tous les "th" que l'on peut rencontrer dans la langue de Shakespeare.

Merci à Vincent Schlageter et Michel Demierre de leur amitié et de m'avoir supporté. Je sais que cela n'a pas été facile tous les jours.

Je remercie Stéphany Gardier, qui par sa venue, m'a fait sortir du 4^{ème} et s'est installée dans "mon bureau". Elle m'a apporté son expérience et de précieux conseils pour la rédaction de ce manuscrit.

Enfin, merci à tous mes amis, bien qu'ils soient pour la plupart assez loin, d'être restés mes amis et de toujours être là quand j'en ai besoin. Merci aussi pour tous ces week-end et multiples fêtes que l'on a pu faire ensemble.

Enfin et surtout, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Esther et à ma famille d'être là et de m'avoir soutenu, même quand je n'ai pas eu beaucoup de temps à leur consacrer. Je tiens à les remercier pour leur soutien durant toute la rédaction de ce manuscrit.

RESUME

Physiopathologie du cœur embryonnaire soumis à l'anoxie-réoxygénation: Rôle protecteur du NO et des canaux K_{ATP} .

Introduction : Dans le cœur adulte, l'ischémie et la reperfusion entraînent des perturbations électriques, mécaniques, biochimiques et structurales qui peuvent causer des dommages réversibles ou irréversibles selon la sévérité de l'ischémie. Malgré les récents progrès en cardiologie et en chirurgie fœtales, la connaissance des mécanismes impliqués dans la réponse du myocarde embryonnaire à un stress hypoxique transitoire demeure lacunaire. Le but de ce travail a donc été de caractériser les effets chrono-, dromo- et inotropes de l'anoxie et de la réoxygénation sur un modèle de cœur embryonnaire isolé. D'autre part, les effets du monoxyde d'azote (NO) et de la modulation des canaux K_{ATP} mitochondriaux (mito K_{ATP}) sur la récupération fonctionnelle postanoxique ont été étudiés. La production myocardique de radicaux d'oxygène (ROS) et l'activité de MAP Kinases (ERK et JNK) impliquées dans la signalisation cellulaire ont également été déterminées.

Méthodes : Des cœurs d'embryons de poulet âgés de 4 jours battant spontanément ont été placés dans une chambre de culture puis soumis à une anoxie de 30 min suivie d'une réoxygénation de 60 min. L'activité électrique (ECG), les contractions de l'oreillette, du ventricule et du conotruncus (détectées par photométrie), la production de ROS (mesure de la fluorescence du DCFH) et l'activité kinase de ERK et JNK dans le ventricule ont été déterminées au cours de l'anoxie et de la réoxygénation. Les cœurs ont été traités avec un bloqueur des NO synthases (L-NAME), un donneur de NO (DETA-NONOate), un activateur (diazoxide) ou un inhibiteur (5-HD) des canaux mito K_{ATP} , un inhibiteur non-spécifique des PKC (chélérythrine) ou un piègeur de ROS (MPG).

Résultats : L'anoxie et la réoxygénation entraînaient des arythmies (essentiellement d'origine auriculaire) semblables à celles observées chez l'adulte, des troubles de la conduction (blocs auriculo-ventriculaires de 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} degré) et un ralentissement marqué du couplage excitation-contraction (E-C) ventriculaire. En plus de ces arythmies, la réoxygénation déclenchait le phénomène de Wenckebach, de rares échappements ventriculaires et une sidération myocardique. Aucune fibrillation, conduction rétrograde ou activité ectopique n'ont été observées. Le NO exogène améliorait la récupération postanoxique du couplage E-C ventriculaire alors que l'inhibition des NOS la ralentissait. L'activation des canaux mito K_{ATP} augmentait la production mitochondriale de ROS à la réoxygénation et accélérail la récupération de la conduction (intervalle PR) et du couplage E-C ventriculaire. La protection de ce couplage était abolie par le MPG, la chélérythrine ou le L-NAME. Les fonctions électrique et contractile de tous les cœurs récupéraient après 30-40 min de réoxygénation. L'activité de ERK et de JNK n'était pas modifiée par l'anoxie, mais doublait et quadruplait, respectivement, après 30 min de réoxygénation. Seule l'activité de JNK était diminuée (-60%) par l'activation des canaux mito K_{ATP} . Cet effet inhibiteur était partiellement aboli par le 5-HD.

Conclusion: Dans le cœur immature, le couplage E-C ventriculaire semble être un paramètre particulièrement sensible aux conditions d'oxygénation. Sa récupération postanoxique est améliorée par l'ouverture des canaux mito K_{ATP} via une signalisation impliquant les ROS, les PKC et le NO. Une réduction de l'activité de JNK semble également participer à cette protection. Nos résultats suggèrent que les mitochondries jouent un rôle central dans la modulation des voies de signalisation cellulaire, en particulier lorsque les conditions métaboliques deviennent défavorables. Le cœur embryonnaire isolé représente donc un modèle expérimental utile pour mieux comprendre les mécanismes associés à une hypoxie in utero et pour améliorer les stratégies thérapeutiques en cardiologie et chirurgie fœtales.

ABSTRACT

Physiopathology of the anoxic-reoxygenated embryonic heart: Protective role of NO and K_{ATP} channel

Aim: In the adult heart, the electrical, mechanical, biochemical and structural disturbances induced by ischemia and reperfusion lead to reversible or irreversible damages depending on the severity and duration of ischemia. In spite of recent advances in fetal cardiology and surgery, little is known regarding the cellular mechanisms involved in hypoxia-induced dysfunction in the developing heart. The aim of this study was to precisely characterize the chrono-, dromo- and inotropic disturbances associated with anoxia-reoxygenation in an embryonic heart model. Furthermore, the roles that nitric oxide (NO), reactive oxygen species (ROS), mitochondrial K_{ATP} (mitoK_{ATP}) channel and MAP Kinases could play in the stressed developing heart have been investigated.

Methods: Embryonic chick hearts (4-day-old) were isolated and submitted *in vitro* to 30 min anoxia followed by 60 min reoxygenation. Electrical (ECG) and contractile activities of atria, ventricle and conotruncus (photometric detection), ROS production (DCFH fluorescence) and ERK and JNK activity were determined in the ventricle throughout anoxia-reoxygenation. Hearts were treated with NO synthase inhibitor (L-NAME), NO donor (DETA-NONOate), mitoK_{ATP} channel opener (diazoxide) or blocker (5-HD), PKC inhibitor (chelerythrine) and ROS scavenger (MPG).

Results: Anoxia and reoxygenation provoked arrhythmias (mainly originating from atrial region), troubles of conduction (1st, 2nd, and 3rd degree atrio-ventricular blocks) and disturbances of excitation-contraction (E-C) coupling. In addition to these types of arrhythmias, reoxygenation triggered Wenckebach phenomenon and rare ventricular escape beats. No fibrillations, no ventricular ectopic beats and no electromechanical dissociation were observed. Myocardial stunning was observed during the first 30 min of reoxygenation. All hearts fully recovered their electrical and mechanical functions after 30-40 min of reoxygenation. Exogenous NO improved while NOS inhibition delayed E-C coupling recovery. MitoK_{ATP} channel opening increased reoxygenation-induced ROS production and improved E-C coupling and conduction (PR) recovery. MPG, chelerythrine or L-NAME reversed this effect. Reoxygenation increased ERK and JNK activities 2- and 4-fold, respectively, while anoxia had no effect. MitoK_{ATP} channel opening abolished the reoxygenation-induced activation of JNK but had no effect on ERK activity. This inhibitory effect was partly reversed by mitoK_{ATP} channel blocker but not by MPG.

Conclusion: In the developing heart, ventricular E-C coupling was found to be specially sensitive to hypoxia-reoxygenation and its postanoxic recovery was improved by mitoK_{ATP} channel activation via a ROS-, PKC- and NO-dependent pathway. JNK inhibition appears to be involved in this protection. Thus, mitochondria can play a pivotal role in the cellular signalling pathways, notably under critical metabolic conditions. The model of isolated embryonic heart appears to be useful to better understand the mechanisms underlying the myocardial dysfunction induced by an *in utero* hypoxia and to improve therapeutic strategies in fetal cardiology and surgery.

ABREVIATIONS

5-HD : 5-hydroxydécanoate
ABC : ATP Binding Cassette (cassette de liaison à l'ATP)
ADP: Adénosine DiPhosphate
ANT : Adenine Nucleotide Transporter (transporteur d'ATP/ADP)
ATP : Adénosine TriPhosphate
AV : Auriculo Ventriculaire
CAT : catalase
Cx : connexine
Cyt C : cytochrome C
DAG : DiAcylGlycérol
DCFH : 2',7'-dichlorofluoresceine
DCFH-DA : forme diacetate du DCFH
E-C : Excitation-Contraction (couplage)
EMD : ElectroMechanical Delay (délai électromécanique)
ERK : Extracellular Regulated Kinase
FADH₂: Flavine adénine dinucléotide
GMP_c : Guanidine MonoPhosphate cyclique
GPx : glutathion peroxydase
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférase
GTP : Guanidine TriPhosphate
IPC : Ischemic PreConditioning (préconditionnement ischémique)
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
K_{ATP} (canaux) : canaux potassiques sensibles à l'ATP
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
mitoK_{ATP} (canaux) : canaux potassiques mitochondriaux sensibles à l'ATP
MPG : 2-N-Mercapto-Propionyl-Glycine
MPTP : Mitochondrial Permeability Transition Pore (pore mitochondrial de perméabilité transitoire)
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAD(P) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCX : échangeur Na⁺/Ca²⁺
NHE : échangeur Na⁺/H⁺
NOS : synthase du monoxyde d'azote
PBS : Phosphate Buffer Saline
PKB : Protéine Kinase B
PKC : Protéine Kinase C

RNS : Reactive Nitrogen Species (espèce radicalaire de l'azote)
ROS : Reactive Oxygen Species (espèce radicalaire de l'oxygène)
sarcK_{ATP} (canaux) : canaux potassiques sarcolemmiques sensibles à l'ATP
SDH : Succinate DésHydrogénase
SERCA : Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SOD : SuperOxyde Dismutase
VDAC :Voltage Activated Anion Channel (canal anionique dépendant du voltage)
XDH : Xanthine DésHydrogénase
XO : Xanthine Oxydase
XOR : Xanthine OxydoRéductase

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	5
I. L'ischémie-reperfusion myocardique.....	5
I.1. <i>Les conséquences métaboliques de l'ischémie-reperfusion</i>	6
I.2. <i>Les perturbations ioniques pendant l'ischémie-reperfusion.....</i>	6
I.3. <i>Les dysfonctionnements contractiles et les dommages cellulaires liés à l'ischémie-reperfusion.....</i>	8
I.4. <i>Dysfonctionnement mitochondrial</i>	9
II. Le stress oxydatif	11
II.1. <i>Les espèces radicalaires produites lors de la reperfusion myocardique</i>	12
II.1.a. L'anion superoxyde	12
II.1.b. Le peroxyde d'hydrogène.....	12
II.1.c. Le radical hydroxyle	12
II.1.d. L'acide hypochloreux.....	12
II.1.e. Le monoxyde d'azote.....	13
II.1.f. Le peroxyde d'azote.....	13
II.1.g. Les autres radicaux, alkyle, alkoxy et alkoperoxyde	13
II.2. <i>Les sources de radicaux lors de l'ischémie-reperfusion.....</i>	13
II.2.a. Les leucocytes activés.....	14
II.2.b. La xanthine oxydase (XO).....	15
II.2.c. Les NAD(P)H oxydases.....	15
II.2.d. Les NO synthases.....	16
II.2.e. La chaîne respiratoire mitochondriale.....	16
II.2.f. Les autres systèmes	20
II.3. <i>Les systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques</i>	20
II.3.a. Les superoxyde dismutases.....	20
II.3.b. Les catalases.....	20
II.3.c. Le système glutathion	21
II.3.d. Les systèmes antioxydants non enzymatiques	21
II.4. <i>Effets des radicaux libres.....</i>	22
II.4.a. Dommages causés aux constituants cellulaires.....	22
II.4.b. Conséquences fonctionnelles du stress oxydatif.....	24
II.4.c. Rôle physiologique des radicaux dans la signalisation cellulaire.....	25
III. La cardioprotection.....	26
III.1. <i>Le préconditionnement ischémique.....</i>	26
III.2. <i>Le préconditionnement pharmacologique</i>	27
III.2.a. L'adénosine	27
III.2.b. La bradykinine	27
III.2.c. Les opiacés.....	28

III.3. Autres traitements cardioprotecteurs	28
III.4. Mécanismes impliqués dans la cardioprotection	29
III.4.a. Rôle des protéines kinases C (PKC).....	29
III.4.b. Rôle des Tyrosine Kinases	30
III.4.c. Rôle des MAPK.....	30
III.4.d. Rôle des radicaux, ROS et RNS	32
IV. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}).....	33
IV.1. Structure et fonction des canaux K_{ATP} sarcolemmiques ($sarck_{ATP}$).....	34
IV.2. Pharmacologie des canaux K_{ATP}	37
IV.3. Structure et fonction des canaux K_{ATP} mitochondriaux ($mitoK_{ATP}$).....	38
IV.3.a. Evidences supportant l'existence des canaux $mitoK_{ATP}$	38
IV.3.b. Fonction des canaux $mitoK_{ATP}$	41
IV.4. Canaux K_{ATP} et cardioprotection	41
V. Caractéristiques du cœur embryonnaire de poulet.....	45
V.1. Cardiogenèse	45
V.2. Métabolisme énergétique	45
V.3. Canaux et transporteurs.....	46
V.4. Réponse à l'ischémie-reperfusion.....	46
V.5. Cardioprotection du cœur immature	47
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	48
I. Caractérisation de l'ECG et des arythmies dans le cœur fœtal.....	48
II. Effet du NO sur le couplage excitation-contraction (E-C).....	49
III. Protection par l'activation des canaux K_{ATP} mitochondriaux ($mitoK_{ATP}$)	49
IV. Modulation des MAPK par l'anoxie-réoxygénation.....	50
MATERIEL ET METHODES	51
I. Montage du cœur <i>in vitro</i>.....	51
II. Protocole expérimental d'anoxie-réoxygénation	52
III. Activités électrique et contractile.....	52
III.1. Enregistrement de l'activité électrique (ECG et électrogramme).....	52
III.2. Enregistrement de l'activité contractile.....	53
III.3. Mesure des paramètres fonctionnels.....	55
III.3.a. Paramètres électriques.....	55
III.3.b. Paramètres contractiles.....	56
III.3.c. Couplage excitation-contraction.....	56

IV. Production radicalaire myocardique	56
V. Activité kinase (ERK et JNK)	59
V.1. <i>Préparation des échantillons</i>	59
V.2. <i>Expression et purification des protéines de fusion Glutathion-S-Transférase (GST)</i>	59
V.3. <i>Dosage de l'activité des kinases ERK et JNK</i>	60
VI. Dosages des protéines et du glycogène	61
VII. Statistiques.....	61
RESULTATS.....	62
I. Caractérisation électrocardiographique du cœur embryonnaire.....	62
I.1. <i>Stabilité des paramètres fonctionnels in vitro</i>	62
I.2. <i>Effets de l'anoxie-réoxygénation</i>	64
I.3. <i>Type et incidence des arythmies déclenchées par l'anoxie-réoxygénation</i>	66
I.4. <i>Réponse de l'oreillette, du ventricule et du conotruncus isolés à l'anoxie-réoxygénation</i>	70
I.5. <i>Discussion</i>	72
II. Rôle du NO dans la récupération du couplage E-C ventriculaire	76
II.1. <i>Introduction</i>	76
II.2. <i>Résultats</i>	76
II.3. <i>Discussion</i>	76
III. Rôle des canaux K_{ATP} mitochondriaux (mitoK_{ATP}) dans la récupération postanoxique	78
III.1. <i>Introduction</i>	78
III.2. <i>Résultats</i>	79
III.3. <i>Discussion</i>	79
IV. Modulation de l'activité des MAPK au cours de l'anoxie et de la réoxygénation	82
IV.1. <i>Introduction</i>	82
IV.1.a. <i>Activation de ERK et JNK par l'ischémie et la reperfusion</i>	82
IV.1.b. <i>Rôle des MAPK dans la cardioprotection</i>	82
IV.2. <i>Résultats et discussion</i>	83
IV.2.a. <i>Profil d'activité de ERK</i>	83
IV.2.b. <i>Profil d'activité de JNK</i>	84
IV.2.c. <i>Effet de l'ouverture des canaux mitoK_{ATP} sur l'activité de JNK</i>	84
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	87

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
ANNEXES	114

INTRODUCTION

I. L'ischémie-reperfusion myocardique

Une diminution anormale de la perfusion d'un organe ou d'un tissu (ischémie), aboutit à une réduction de l'apport en oxygène (hypoxie) et en nutriments.

Dans le cas du myocarde adulte, l'ischémie est généralement due à l'obstruction accidentelle partielle ou totale d'une artère coronaire, mais peut également s'imposer lors de la chirurgie cardiaque ou dans le cas de la transplantation cardiaque. Le déséquilibre entre l'apport en oxygène et la demande métabolique aboutit à des perturbations électriques, mécaniques, biochimiques et structurales pouvant entraîner une mort cellulaire. Ces altérations sont dans un premier temps réversibles, constituant essentiellement une diminution de la concentration en ATP accompagnée d'une diminution de l'activité cellulaire (*Hoffmeister et al., 1986*). Si le tissu est reperfusé rapidement, les cellules resteront viables.

Si par contre, l'ischémie est prolongée, les altérations vont aboutir à une mort cellulaire, par apoptose (mort cellulaire programmée) puis par nécrose (mort par lyse des cellules) (*Logue et al., 2005*). Cette nécrose se propage dans le myocarde, de l'endocarde vers l'épicarde, et la zone nécrosée sera ensuite remplacée par du tissu cicatriciel incapable de se contracter.

La reperfusion est donc indispensable à la survie du tissu, dans la mesure où elle limite les lésions tissulaires qui suivent une ischémie plus ou moins prolongée. C'est d'ailleurs la seule méthode connue permettant de sauvegarder le myocarde ischémique des lésions tissulaires irréversibles. Mais la reperfusion est une "épée à double tranchant" (Figure 1) car elle est aussi associée à des altérations fonctionnelles réversibles comme la sidération myocardique ou les arythmies, et des altérations irréversibles comme la nécrose tissulaire. Ce phénomène où la réoxygénation est indispensable pour la survie myocardique mais a des effets délétères est appelé le "paradoxe de l'oxygène".

RÉOXYGÉNATION ou REPERFUSION MYOCARDIQUE
« une épée à double tranchant »

Elle est nécessaire mais induit des perturbations:

ÉLECTRIQUES	<i>(arythmies; propagation)</i>
MÉCANIQUES	<i>(contractilité; myofilaments)</i>
BIOCHIMIQUES	<i>(métabolisme énergétique)</i>
STRUCTURALES	<i>(membrane, mitochondrie)</i>
SIGNALISATION	<i>(p.e. MAPK, JAK-STAT...)</i>
APOPTOSE	<i>(p.e. expression de Bax/Bcl-2)</i>

Figure 1 : La reperfusion est une “épée à double tranchant”. Les types de perturbations pouvant survenir au cours de la réoxygénation sont indiqués.

I.1. Les conséquences métaboliques de l'ischémie-reperfusion

En conditions physiologiques, l'apport en énergie du myocarde adulte est assuré essentiellement par l'oxydation des acides gras libres (Zierler, 1976) plutôt que par celle du glucose (70% contre 30%).

Lors d'une ischémie, le cœur réduit son activité mécanique en réponse à une diminution d'apport énergétique due à une perfusion insuffisante (Heusch, 1998). Dans ce cas, le myocarde augmente sa consommation anaérobie de glucose (Rumsey et al., 1999; Argaud et Ovize, 2000), le métabolisme énergétique devenant alors plus glycolytique qu'oxydatif.

I.2. Les perturbations ioniques pendant l'ischémie-reperfusion

L'activation de la glycolyse anaérobie se traduit par la production de lactate et de protons entraînant une acidification intracellulaire, évaluée à 1 unité pH en 10 minutes environ (Allen et Xiao, 2003). Cette acidification va entraîner l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ membranaire (isoforme NHE-1 dans le myocarde) afin d'expulser des protons, de même que l'activation d'un autre système alcalinisant, le symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$.

L'augmentation de l'activité de ces systèmes aboutit à une augmentation de la concentration sodique intracellulaire. Du fait du manque d'ATP cellulaire, la pompe Na^+/K^+ -ATPase va expulser moins de sodium, ce qui va diminuer voire même inverser l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Ce mode de fonctionnement inversé de l'échangeur NCX se traduit par une augmentation de la concentration cytosolique en calcium (Allen et Xiao, 2003) (Figure 2). Ainsi, la mise en route de systèmes neutralisant l'acidification cellulaire due au changement de substrat énergétique du cœur va aboutir à une surcharge sodique et calcique du cytosol.

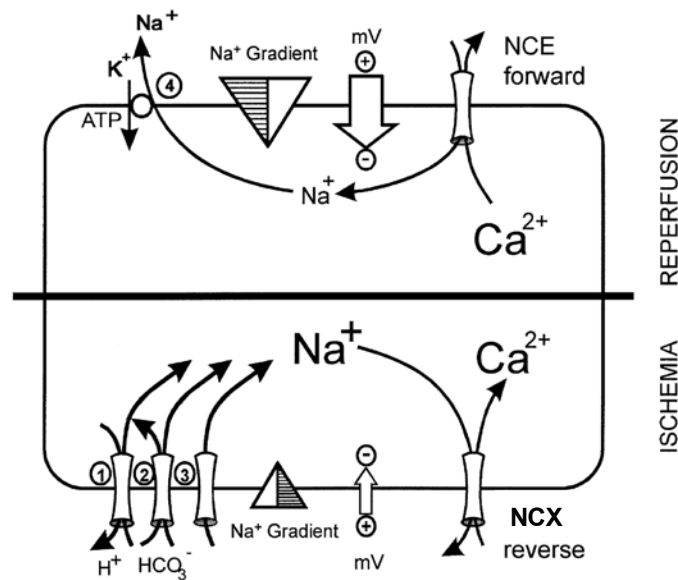


Figure 2 : Perturbations ioniques durant l'ischémie-reperfusion (Piper et al., 2003), NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, 1 : NHE1 ; 2 : symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$; 3 : autres transporteurs et 4 : Na^+/K^+ -ATPase.

Lors de la reperfusion, si la chaîne respiratoire a subi peu d'altérations durant l'ischémie et reste fonctionnelle, le taux d'ATP cellulaire augmente très rapidement, et alimente ainsi les différentes pompes, Na^+/K^+ -ATPase, et la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA-2). L'activité de SERCA permet de pomper le calcium à l'intérieur du réticulum. Si la surcharge calcique cytosolique est importante, le réticulum ne peut pas contenir tout le calcium, ce qui entraîne des oscillations de la concentration calcique par des cycles successifs de capture et de libération du calcium. De plus, si durant l'ischémie le gradient sodique diminue suffisamment, le calcium entre dans la cellule par

fonctionnement inverse de l'échangeur NCX, contribuant à la surcharge et aux oscillations calciques (Piper et al., 2003).

Le fonctionnement du NHE-1 durant l'ischémie acidifie le milieu interstitiel. Le rétablissement du flux coronaire va très rapidement normaliser le pH interstitiel. Le gradient de proton créé par cette normalisation du pH extracellulaire va activer le NHE-1, entraînant une normalisation rapide du pH intracellulaire par extrusion des protons mais aboutissant aussi à une entrée de sodium qui active alors le NCX en mode inverse participant ainsi à la surcharge et aux oscillations calciques post-ischémiques (Allen et Xiao, 2003).

De surcroît, le métabolisme anaérobie durant l'ischémie conduit à une augmentation de pression osmotique intracellulaire et interstitielle. Le rétablissement du flux coronaire entraîne une chute brutale de pression osmotique interstitielle, créant ainsi un fort gradient osmotique entre les milieux intercellulaire et interstitiel, faisant entrer de l'eau dans les cellules. Le gonflement cellulaire, ajouté à la fragilisation du cytosquelette peut entraîner la rupture de la membrane cellulaire (Piper et al., 1998).

I.3. Les dysfonctionnements contractiles et les dommages cellulaires liés à l'ischémie-reperfusion.

Lors de l'ischémie, l'amplitude de contraction des cardiomyocytes diminue très rapidement (Heusch, 1998) mais est maintenue tant que l'énergie est disponible en quantité suffisante sous forme d'ATP. Lorsque la concentration d'ATP est proche de zéro, les têtes de myosine restent liées au filament d'actine, créant une contracture à l'origine d'une fragilisation du cytosquelette des cardiomyocytes. Si l'ischémie est maintenue, cette contracture peut aboutir à une nécrose cellulaire (Piper et al., 1998; Piper et al., 2003).

A la reperfusion, dès que l'ATP est à nouveau disponible, la machinerie contractile se remet en route. Cette activité, associée à la surcharge calcique et aux oscillations calciques, va aboutir à une hypercontracture (Rodrigo et Standen, 2005), qui, agissant sur un cytosquelette fragilisé, peut générer des lésions irréversibles par nécrose (Ganote, 1983; Piper et Garcia-Dorado, 1999). Les oscillations de concentration calcique sont probablement à

l'origine des arythmies observées à la reperfusion (fibrillation ventriculaires, extrasystoles ventriculaires principalement) (Hearse, 1992; Lee et al., 2002; Das et Sarkar, 2003a; Rajesh et al., 2004).

Même lorsque la circulation coronaire est rétablie assez tôt pour qu'il n'y ait pas de dommages irréversibles au niveau cellulaire, la reperfusion entraîne un dysfonctionnement cardiaque réversible appelé sidération myocardique ou "stunning" (Bolli et Marban, 1999; Ambrosio et Tritto, 2002). La sidération du myocarde se traduit par une diminution des fonctions systolique et diastolique (Charlat et al., 1989) qui peuvent récupérer en quelques heures, voire quelques jours. Une des hypothèses expliquant ce délai de récupération est une surproduction de radicaux libres d'oxygène ou d'azote, entraînant un stress oxydatif (cf. **II. Le stress oxydatif**) durant l'ischémie et la reperfusion (Bolli et al., 1998; Bolli et Marban, 1999; Bolli, 2001; Tang et al., 2002). L'activité protéolytique des calpaïnes pourrait également participer aux dysfonctionnements contractiles et à la mort cellulaire. En effet, l'activation de ces protéases par le calcium lors de l'ischémie-reperfusion pourrait conduire à la lyse de protéines impliquées dans la fonction contractile (α -actinine) ou l'intégrité cellulaire (spectrine) (Perrin et al., 2004).

I.4. Dysfonctionnement mitochondrial

Les mitochondries représentent environ 37% du volume cellulaire dans les cardiomyocytes adultes (Kanai et al., 2001). Il en existe deux populations, les mitochondries subsarcolemmiques (SSM) et les mitochondries interfibrillaires (IFM). Les premières sont situées à proximité de la membrane cellulaire, les secondes proches des myofibrilles (Palmer et al., 1985). Ces deux populations de mitochondries, du fait de leur localisation et propriétés différentes, ne sont pas affectées de la même manière par l'ischémie (Lesnefsky et al., 2001). Il est de plus en plus admis que la mitochondrie, en dehors de sa fonction bioénergétique, joue un rôle central dans les voies de signalisation cellulaire, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques (Marin-Garcia et Goldenthal, 2004; O'Rourke et al., 2005).

La concentration calcique augmente dans le cytosol durant l'ischémie entraînant également une accumulation du calcium dans la mitochondrie. La capacité des SSM vis-à-vis de l'accumulation calcique est limitée et cette dernière crée un gonflement de la mitochondrie par entrée d'eau, ainsi que des dépôts calciques intra mitochondriaux, aboutissant à la libération de cytochrome C (Cyt C). Les IFM sont beaucoup moins sensibles à la surcharge calcique et ne libèrent pas de Cyt C (*Palmer et al., 1986*). La reperfusion est associée à une diminution transitoire de la concentration calcique intra mitochondriale, suivie d'une surcharge calcique associée à l'ouverture du pore mitochondrial de perméabilité transitoire (MPTP) (*Murata et al., 2001*), favorisant la libération de Cyt C. L'ouverture du MPTP coïncide avec la diminution du potentiel électrochimique mitochondrial (*Akao et al., 2003*). La diminution du gradient électrochimique va entraîner un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et participer aux perturbations contractiles par manque d'ATP et par production de radicaux, et à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, via l'ouverture du MPTP et la libération de Cyt C (*Marczin et al., 2003*). La libération de Cyt C par les SSM va, en effet, activer des caspases cytosoliques qui participent à la signalisation pro-apoptotique (*Logue et al., 2005*). Il a été démontré que l'inhibition du MPTP par la cyclosporine A ou la sanglifehrine A pouvait diminuer le nombre de cellules apoptotiques ou nécrotiques (*Halestrap et al., 2004; Hausenloy et al., 2004; Argaud et al., 2005; Facundo et al., 2005*). L'activation des caspases, suite à la libération de Cyt C (*Logue et al., 2005*), aggrave la surcharge calcique en inhibant les pompes calciques par protéolyse (*Paszty et al., 2002*).

Lors de l'ischémie, le métabolisme n'utilise plus les acides gras mais la glycolyse anaérobie, ce qui va entraîner une accumulation d'acyl-coenzyme A longs dans les myocytes. Cette accumulation va inhiber le transport à travers le complexe transporteur d'ATP/ADP (ANT) dont l'activité est couplée à la chaîne respiratoire (*Jassem et al., 2002*).

L'ischémie crée des dommages au niveau de la chaîne respiratoire tels qu'une réduction progressive des protéines fer-soufre associées au complexe I et II de la chaîne respiratoire (NADH déshydrogénase et succinate déshydrogénase respectivement), et aboutit à la libération d'ions ferreux qui vont catalyser la formation de nouveaux radicaux

lors de la reperfusion (cf. **II. Le stress oxydatif**). L'ischémie prolongée va étendre les dommages aux complexes III et IV (Petrosillo et al., 2003).

Les défenses antioxydantes de la mitochondrie sont diminuées lors d'un déficit de perfusion, en particulier le taux de glutathion (Mansfield et al., 2004), et l'activité des superoxyde dismutases (SOD) (Arduini et al., 1988).

II. Le stress oxydatif

Les radicaux d'oxygène (ROS) ou d'azote (RNS) sont des molécules dont un atome possède un électron non apparié ou "célibataire" sur son orbitale externe. Les radicaux ont en général une durée de vie extrêmement brève du fait de leur grande réactivité (de l'ordre de la microseconde). Les électrons célibataires vont en effet essayer de se "réappairer". Les radicaux principaux sont l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle $\bullet OH$, le monoxyde d'azote $\bullet NO$, et les radicaux secondaires issus de réactions entre ces radicaux et les acides gras, protéines ou glucides. Enfin, il existe des molécules ne possédant pas d'électron libre, mais hautement réactives, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'acide hypochloreux $HOCl$ et le dérivé du monoxyde d'azote, le peroxy-nitrite $ONOO^-$ (Halliwell et Gutteridge, 1998b; Dhalla et al., 2000; Souchard et al., 2002; MacCarthy et Shah, 2003).

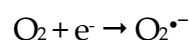
Durant l'ischémie, du fait du manque d'oxygène, peu ou pas de radicaux sont produits, mais leur production est importante à la reperfusion (Xu et al., 2001), d'autant plus que l'ischémie précédente a été longue (Li et Jackson, 2002).

Le stress oxydatif est dû à un déséquilibre entre la production de radicaux par les systèmes oxydants et leur élimination par les systèmes antioxydants.

II.1. Les espèces radicalaires produites lors de la reperfusion myocardique

II.1.a. L'anion superoxyde

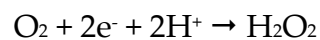
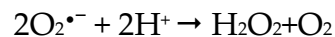
L'anion superoxyde est issu de la réaction de l'oxygène moléculaire avec un électron :



Il est produit normalement dans toutes les cellules par la respiration mitochondriale et environ 2% de l'oxygène consommé par la cellule se transforme en $O_2^{\bullet-}$ (Herrero et Barja, 1997).

II.1.b. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par la dismutation de l'anion superoxyde (spontanée ou par la superoxyde dismutase), ou par réduction bivalente de l'oxygène :



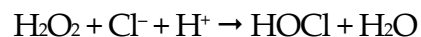
II.1.c. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) provient de la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène par la réaction d'Haber-Weiss, et par la réaction de Fenton dans laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'ion ferreux qui peut provenir de la réduction des protéines fer-soufre :



II.1.d. L'acide hypochloreux

L'acide hypochloreux ($HOCl$) est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène et de l'ion chlorure :

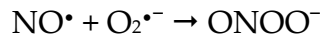


II.1.e. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est produit par les synthèses du monoxyde d'azote (NOS) à partir de la L-arginine (voir ci-après **II.2.d. Les NO synthèses**).

II.1.f. Le peroxydinitrite

Le peroxydinitrite ($ONOO^-$) très réactif, est issu de la réaction très rapide (constante de vitesse $k \sim 6,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) du monoxyde d'azote avec l'anion superoxyde :



II.1.g. Les autres radicaux, alkyle, alkoxy et alkoperoxy

Ils sont issus de la réaction de l'anion superoxyde ou de l'hydroxyle sur les chaînes d'acide gras, les protéines et les glucides. Ces chaînes sont conventionnellement notées "R". Les radicaux sont donc notés R• (alkyle), RO• (alkoxy) et ROO• (alkoperoxyde).

II.2. *Les sources de radicaux lors de l'ischémie-reperfusion*

Les radicaux sont produits naturellement dans l'organisme par le métabolisme cellulaire ou des réactions d'oxydo-réduction (Figure 3). Les macrophages et polynucléaires neutrophiles du système immunitaire peuvent également produire des radicaux lors de leur activation par les micro-organismes. Dans le système cardiovasculaire, les sources principales de superoxyde sont les leucocytes activés, la xanthine oxydase, les NAD(P)H oxydases, les NOS, et surtout la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Souchard *et al.*, 2002; MacCarthy *et Shah*, 2003).

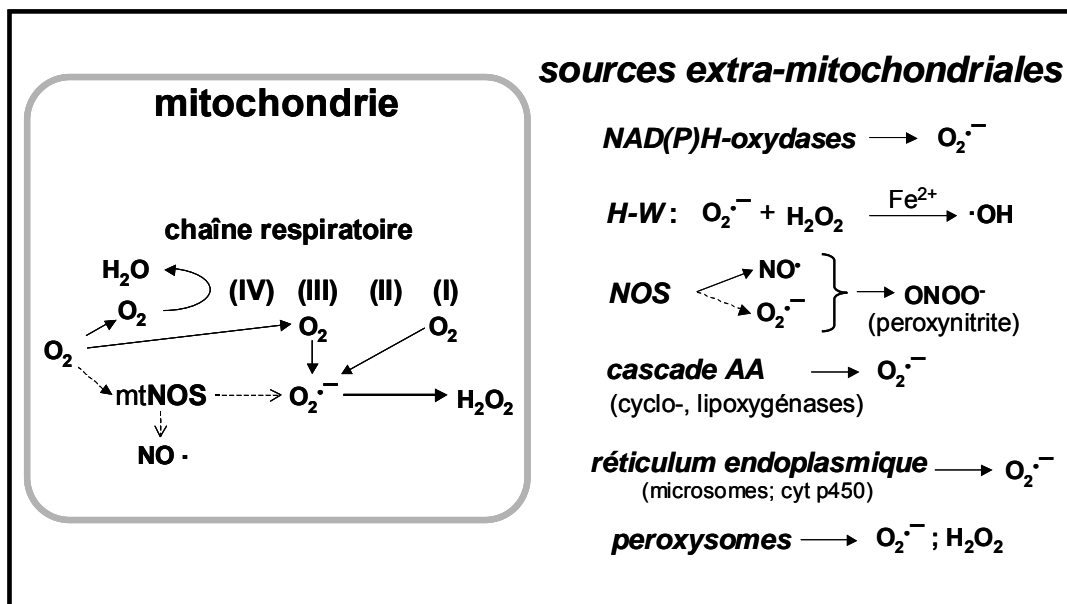


Figure 3 : La mitochondrie est la source principale de ROS dans la cellule. I-IV : complexes de la chaîne respiratoire ; NOS : synthase du monoxyde d'azote ; mtNOS : NOS mitochondriale ; H-W : réaction d'Haber-Weiss ; AA : acide arachidonique.

II.2.a. Les leucocytes activés

Les polynucléaires neutrophiles, essentiellement, possèdent une forte concentration en NAD(P)H oxydase au niveau des phagosomes et des membranes. L'activité de cette enzyme est faible à l'état basal, mais lorsque ces cellules sont activées par des stimuli inflammatoires tels que l'opsonisation, la NAD(P)H oxydase peut produire de grande quantité d'anion superoxyde à partir de l'oxygène, entraînant une "bouffée respiratoire". L'anion superoxyde peut être transformé en peroxyde d'hydrogène, qui, en présence de fer, va être converti en radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss. Le peroxyde d'hydrogène peut également être converti, par la myéloperoxydase en présence de chlorure, en acide hypochloreux, fortement réactif. Ces espèces radicalaires peuvent se limiter au phagosome et participer à la lyse bactérienne, mais également être libérés par exocytose et participer ainsi au phénomène d'inflammation (*Souchard et al., 2002*). Dans le cas de l'ischémie cardiaque, une telle réaction inflammatoire participe à la nécrose du tissu ischémique.

II.2.b. La xanthine oxydase (XO)

La xanthine oxydase (XO) fait partie du complexe xanthine oxydoréductase (XOR), qui possède une activité oxydase et une activité déshydrogénase (XDH). La XDH convertit l'hypoxanthine en xanthine en utilisant le NAD⁺ comme accepteur d'électrons, et la XO convertit la xanthine en acide urique en produisant l'anion superoxyde à partir de l'oxygène. Mais lors de situations pathologiques telles que l'ischémie, la XDH peut être convertie en XO par protéolyse (*Bonaventura et Gow, 2004*), et ainsi générer du superoxyde. L'allopurinol, un inhibiteur de xanthine oxydase, exerce un effet protecteur lors d'ischémie-reperfusion myocardique (*Pearlstein et al., 2002*) ou d'occlusion coronaire chronique (*Mellin et al., 2005*).

II.2.c. Les NAD(P)H oxydases

Les NAD(P)H oxydases existent, en plus de la forme présente dans les leucocytes, sous une forme endothéliale et musculaire (muscle lisse et cardiaque) (*Kim et al., 2005*).

Parmi ces différentes isoformes, on distingue 7 membres : Nox-1 à 5 et Duox-1 et 2 (Krause, 2004). Le tissu vasculaire semble contenir les formes Nox-1, Nox-2 et Nox-4 (Wolin et al., 2005). Les formes endothéliales participent pour une part importante à la production radicalaire (superoxyde) lors de la reperfusion. En effet, l'ablation de l'endothélium d'aortes isolées diminue de manière importante la production de superoxyde à la reperfusion (Beswick et al., 2001; Bell, 2004; Sun et al., 2005). De même, p47^{phox}, sous-unité de la NAD(P)H oxydase, semble indispensable à la production de ROS par les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales des vaisseaux de souris invalidées en cette sous-unité sont en effet incapables de produire des radicaux (Li et al., 2002). Enfin, l'apocynine, un inhibiteur des NAD(P)H oxydases, empêche la production de superoxyde dans un modèle d'artère humaine (Liu et al., 2003), ou bovine isolées (Gupte et al., 2005).

II.2.d. Les NO synthases

Les synthases du monoxyde d'azote (NOS) existent sous quatre isoformes, la forme endothéliale (eNOS ou NOS III), la forme neuronale (nNOS ou NOS I), la forme mitochondriale (mtNOS) et la forme inducible (iNOS ou NOS II). Les trois premières isoformes sont constitutives, et produisent en permanence de petites quantités de NO à partir de L-arginine. Lors de la reperfusion, le manque de substrat ou de cofacteur (tetrahydrobioptérine), crée un dysfonctionnement des NOS qui peuvent alors produire à la fois le NO et l'anion superoxyde. Ces deux produits peuvent alors réagir ensemble et former du peroxynitrite ONOO⁻ (Murrant et Reid, 2001).

II.2.e. La chaîne respiratoire mitochondriale

- ***Fonctionnement normal de la chaîne respiratoire mitochondriale***

La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de cinq complexes protéiques ancrés dans la membrane interne de la mitochondrie. Son rôle est de synthétiser l'ATP nécessaire au bon fonctionnement cellulaire. Les différents substrats (glucose, acides gras) permettent la production d'équivalents réducteurs, NADH et FADH₂ par la glycolyse aérobie, le cycle de Krebs et la β -oxydation, qui vont être utilisés dans la chaîne respiratoire

afin de créer un gradient de protons entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale, nécessaire à la synthèse de l'ATP à partir d'ADP par l'ATP-synthase (Figure 4).

Le Complexe I, ou NADH déshydrogénase, est un gros complexe multi-protéique (45 sous-unités) d'environ 750kDa (*Nicholls et Ferguson, 2002*). Il catalyse l'oxydation du NADH en NAD^+ parallèlement à la réduction du coenzyme Q en coenzyme QH_2 . Cette oxydoréduction est couplée à un transport de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Le Complexe II, ou Succinate déshydrogénase, est un petit complexe protéique de 13kDa. Il catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et la réduction du coenzyme Q en coenzyme QH_2 . Cette réaction n'est pas accompagnée d'un transport de protons vers l'espace intermembranaire.

Le Complexe III, ou Coenzyme Q-cytochrome C oxydoréductase est un dimère de protéines de 30kDa chacune. Ce complexe catalyse l'oxydation du coenzyme QH_2 et la réduction du cytochrome C ferrique (cyt C Fe^{3+}) en cytochrome C ferreux (cyt C Fe^{2+}). Cette réaction est couplée à un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Le Complexe IV, ou Cytochrome oxydase, est également un dimère. Chaque protéine le constituant a une masse de 162kDa. La cytochrome oxydase oxyde le cyt C Fe^{2+} en cyt C Fe^{3+} en même temps qu'elle réduit le dioxygène en eau en utilisant les électrons transportés le long de la chaîne respiratoire, et transporte des protons vers l'espace intermembranaire.

Enfin, l'ATP synthase ou F₀F₁-ATP synthase (complexe V) est une protéine de 450kDa, qui couple la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i , et permet donc de transformer le potentiel électrochimique de protons en énergie chimique, c'est-à-dire en ATP (Figure 4).

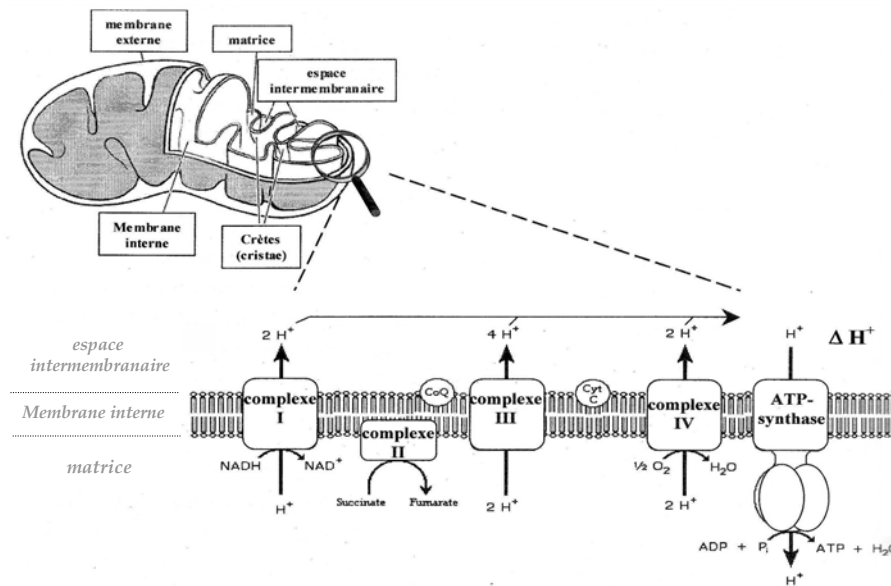


Figure 4 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale ; CoQ : coenzyme Q ou ubiquinol ; Cyt C : Cytochrome C. (tiré de *Servais, 2004*)

- **Production radicalaire par la mitochondrie**

La chaîne respiratoire produit, lors de son fonctionnement normal, de petite quantité d'anion superoxyde. Il a été estimé *in vitro* que la mitochondrie réduisait en superoxyde entre 2 et 4% de l'oxygène consommé (*Herrero et Barja, 1997*).

Les complexes I et III semblent être les sites principaux de production de radicaux par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les différentes études qui ont permis de démontrer et localiser la production de radicaux par la mitochondrie ont utilisé des inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Afin de bien comprendre les différentes conclusions de ces études, les sites d'action des substrats et des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale sont représentés sur la figure 5.

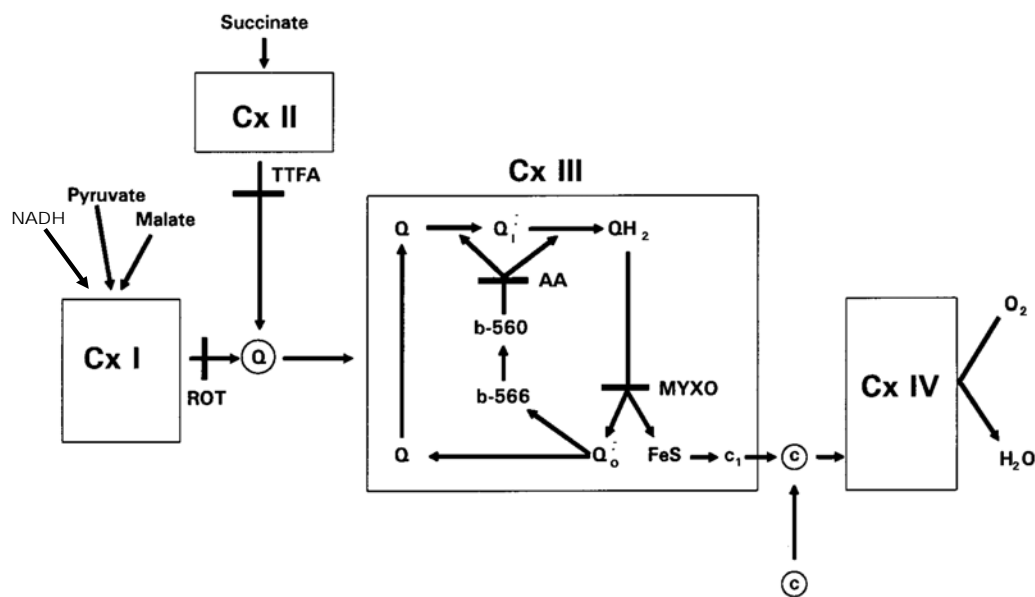


Figure 5 : Sites d'action des substrats et des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (modifié de *Herrero et Barja, 1997*). Cx I-IV : complexes I à IV ; ROT : roténone ; Q : ubiquinone ; TTFA : Thenoyltrifluoroacetone. AA : antimycine A ; MYXO : myxothiazol ; Q_{in} : centre 'in' (côté matriciel) semi-ubiquinone ; Q_{out} : centre 'out' (côté espace intermembranaire) semi-ubiquinone ; FeS : centre Fer-soufre du Complexe III ; c_1 : cytochrome c_1 ; c : cytochrome c.

L'essentiel des études démontrant l'implication des différents complexes dans la production radicalaire a été réalisé sur des mitochondries isolées. Lorsque le substrat est le pyruvate ou le malate (*Herrero et Barja, 1997; McLennan et Degli Esposti, 2000; Staniek et Nohl, 2000*) ou le NADH (*Turrens et Boveris, 1980; Herrero et Barja, 2000; McLennan et Degli Esposti, 2000; Genova et al., 2001*), dont les électrons sont utilisés par le Complexe I, la roténone (inhibiteur du Complexe I) entraîne une augmentation de la production de radicaux, mais cela est sujet à controverse. Cet effet ne se retrouve pas si le substrat est le succinate (*Herrero et Barja, 1997*). De plus, *Herrero et Genova (Herrero et Barja, 2000; Genova et al., 2001)* ont démontré que le site producteur du Complexe I était le centre fer-soufre.

Quelque soit le substrat, l'antimycine A (inhibiteur du Complexe III), entraîne une augmentation de production radicalaire (*Boveris et al., 1972; Turrens et Boveris, 1980; Herrero et Barja, 1997; McLennan et Degli Esposti, 2000; Staniek et Nohl, 2000; Genova et al., 2001*). Le myxothiazol (*Herrero et Barja, 1997; McLennan et Degli Esposti, 2000*), diminue mais n'abolit pas totalement la production due à l'antimycine A. Ceci démontre, d'une part que le

Complexe III peut générer des radicaux (production abolie par le myxothiazol), et d'autre part que le Complexe I est responsable de la production résiduelle.

Le Complexe II peut également, dans une moindre mesure, contribuer à la production de ROS. Ainsi, le succinate augmente la production de H₂O₂ (*Boveris et al., 1972*). De même, la carboxine (inhibiteur du Complexe II), en présence de NADH ou succinate, diminue la production radicalaire induite par l'antimycine A. Le site de production radicalaire au niveau du Complexe II est donc en aval du site d'oxydation du succinate (*McLennan et Degli Esposti, 2000*).

Durant l'ischémie, l'hydrolyse de l'ATP entraîne une élévation de la concentration en phosphates inorganiques libres, qui augmentent la perméabilité de la membrane interne de la mitochondrie (*Kowaltowski et al., 1996*). L'ischémie cause aussi la réduction progressive de protéines fer-soufre associées aux Complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant la libération d'ions ferreux (Fe²⁺) qui permet la réduction d'H₂O₂ par la réaction de Fenton et la production d'hydroxyle à la réoxygénation (*Jassem et al., 2002*). Durant la reperfusion, du fait des modifications de l'état redox de la mitochondrie, le flux d'oxygène dans la mitochondrie entraîne une forte production de radicaux.

II.2.f. Les autres systèmes

La dégradation des catécholamines (*Dhalla et al., 2000*), le métabolisme de l'acide arachidonique (*Souchard et al., 2002*) et l'action de l'angiotensine II (*Kimura et al., 2005*) aboutissent à la production de ROS lors de l'ischémie et de la reperfusion.

II.3. *Les systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques*

Les cellules possèdent des systèmes permettant de neutraliser la production radicalaire physiologique mais potentiellement délétère, le taux de ROS restant ainsi faible. Parmi ces systèmes on distingue des systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques.

II.3.a. Les superoxyde dismutases

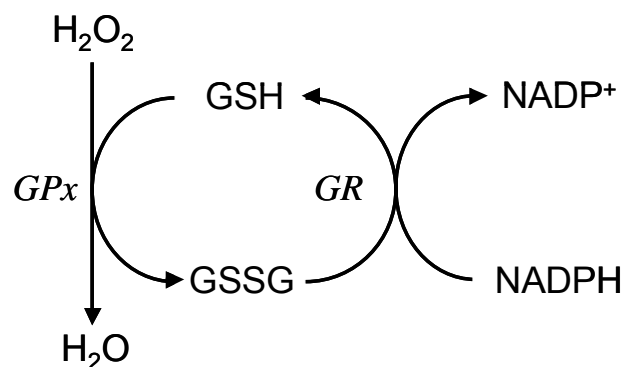
Les superoxyde dismutases (SOD) furent isolées en 1969 par McCord et Fridovich (McCord et Fridovich, 1969). Deux isoformes sont présentes dans le myocarde, une forme cytosolique à cuivre et zinc (Cu/Zn SOD) et une forme mitochondriale à manganèse (Mn SOD). Ces enzymes convertissent l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Leur action, associée à celle des catalases ou de la glutathion peroxydase, évite l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans la cellule et sa conversion en radical hydroxyle.

II.3.b. Les catalases

Les catalases (CAT) convertissent le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Ces enzymes sont essentiellement peroxysomales, mais elles se trouvent aussi dans le cytosol (Ferrari et al., 2004) et la mitochondrie (Bai et Cederbaum, 2001). Leur action semble jouer un rôle important en présence de forte concentration de H_2O_2 , alors que la glutathion peroxydase peut agir sur de faibles quantités de peroxydes.

II.3.c. Le système glutathion

Les glutathion peroxydases (GPx) sont présentes dans le cytosol et les mitochondries. Ces enzymes convertissent le peroxyde d'hydrogène en eau en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électrons. L'oxydation de deux GSH conduit à la formation de glutathion oxydé, GSSG. Cette réaction est couplée à la réduction du GSSG en GSH par la glutathion réductase (GR), qui utilise le NAD(P)H comme cofacteur (Jassem et al., 2002).



Elimination du H_2O_2 par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR

Dans le cœur, 95% du glutathion est sous forme réduite, maintenant ainsi un rapport GSH/GSSG élevé. Tant que le pool de glutathion est maintenu, ou que les enzymes fonctionnent correctement, ce système antioxydant est opérationnel et permet, en concert avec les catalases, l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des formes peroxydées des phospholipides et phosphoprotéines (*Dhalla et al., 2000*).

II.3.d. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Les vitamines, telles que l' α -tocophérol et l'acide ascorbique, l'acide urique et les chélateurs de métaux, tels que les protéines de liaison (iron binding proteins) et de transport du fer, et l'albumine jouent un rôle important dans l'élimination des radicaux (*Dhalla et al., 2000; Souchard et al., 2002*).

- ***La vitamine E***

La vitamine E (α -tocophérol) est un composé lipophile, ce qui lui permet de se localiser au niveau des membranes. Il protège les lipides membranaires de l'oxydation. L' α -tocophérol est réduit en radical par l'échange d'un électron et réagit avec l'acide ascorbique, qui devient alors radicalaire (*Souchard et al., 2002*).

- ***La vitamine C***

L'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant hydrosoluble. La vitamine C peut réagir avec de nombreux radicaux en générant le radical ascorbyle puis l'anion ascorbyle. Le radical ascorbyle peut réagir avec lui-même pour se régénérer. Cette régénération est également possible par le NAD(P)H ou par le glutathion (*Souchard et al., 2002*).

II.4. Effets des radicaux libres

II.4.a. Dommmages causés aux constituants cellulaires

L'excès de radicaux entraîne des dommages au niveau des acides nucléiques, des protéines et des acides gras.

- *Les acides nucléiques*

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles aux radicaux. Les groupements radicalaires ainsi formés peuvent aboutir à des mutations ponctuelles voire des ruptures dans la chaîne d'ADN, en particulier l'ADN mitochondrial (ADN_{mt}). En effet, celui-ci est proche de la source des radicaux, ne possède pas d'histone et dispose de moins de mécanismes de réparation que l'ADN nucléaire. Comme de nombreuses protéines de la chaîne respiratoire sont codées par l'ADN_{mt}, des mutations de cet ADN peuvent perturber la phosphorylation oxydative et par conséquent réduire la synthèse d'ATP (*Zhang et al., 1990*).

- *Les protéines*

Les radicaux produits par la chaîne respiratoire peuvent réagir avec les protéines de cette dernière. En effet, les complexes de la chaîne respiratoire sont très sensibles à l'oxydation. Par exemple, les complexes I, II et IV sont particulièrement sensibles à l'oxydation par ONOO⁻ (*Murray et al., 2003*). L'altération de telles protéines va aboutir à des dysfonctionnements et une diminution de la synthèse d'ATP (*Anaya-Prado et al., 2002*).

D'autres protéines, en particulier les protéines possédant de groupements sulfhydryle (SH) sont susceptibles d'être oxydées par les radicaux. L'oxydation de ces groupements va aboutir à la formation de ponts disulfures entre les protéines, mais également au sein même des protéines, les rendant inactives. Les groupements SH sont entre autre présents dans des protéines de transport et des enzymes cellulaires (*Souchard et al., 2002*).

- *Les acides gras*

Les radicaux peuvent interagir avec les acides gras des membranes plasmiques et mitochondriales et les oxyder. Les dommages au niveau de la membrane interne des mitochondries vont modifier sa perméabilité, perturber le fonctionnement de la chaîne respiratoire et augmenter la production radicalaire. Les modifications de la membrane interne de la mitochondrie entraînent également un découplage et une diminution du rendement de la phosphorylation oxydative. Le gonflement généré par la perméabilité accrue de la membrane interne de la mitochondrie peut aboutir à l'ouverture de MPTP et à la libération de cytochrome C, activant les cascades pro-apoptotiques.

L'attaque de la bicouche lipidique de la membrane plasmique par les espèces radicalaires perturbe également l'organisation de cette bicouche et modifie ses propriétés (fluidité et perméabilité). Les produits de ces réactions (aldéhydes insaturés, malondialdéhydes) peuvent être cytotoxiques et mutagènes. Les interactions lipides-protéines vont également être affectées par ces modifications, et l'activité de nombreuses enzymes associées aux membranes va ainsi être altérée (*Dhalla et al., 2000; Souchard et al., 2002*).

II.4.b. Conséquences fonctionnelles du stress oxydatif

Les effets des radicaux sont cumulatifs. Leur action sur les protéines et les lipides du sarcolemme et du réticulum sarcoplasmique peuvent entraîner des perturbations électriques d'amplitude suffisante pour générer des arythmies (*Ferrari et al., 2004*).

Les radicaux sont aussi capables d'augmenter l'activité de l'échangeur NHE (*Snabaitis et al., 2002*), ajoutant à la surcharge sodique et, par leur action sur les protéines impliquées dans la régulation de la concentration calcique (*Jeroudi et al., 1994; Temsah et al., 1999; Dhalla et al., 2000*), participent à la sidération myocardique. H₂O₂ inhibe par exemple l'activité de la créatine kinase myofibrillaire et celle de la SERCA-2 (*Suzuki et al., 1991; Kaneko et al., 1993*), alors que la SOD et la CAT intracellulaire préviennent cette inhibition.

Les espèces radicalaires peuvent également déclencher l'apoptose cellulaire. En effet, l'ajout de H₂O₂ entraîne l'apoptose de nombreux types de cellules (*Akao et al., 2001; Aikawa et*

al., 2002; Ichinose et al., 2003). Le H₂O₂ induit l'expression du facteur nécrotique de tumeur TNF α qui, à son tour, induit une production de radicaux par activation de la NAD(P)H-oxydase (*Giordano, 2005*), causant l'apoptose (*Aikawa et al., 2002*). Les dommages causés à l'ADN par les radicaux activent la poly-ADP-ribose transférase. La polymérisation de l'ADP-ribose sur les protéines entraîne une diminution rapide du pool cellulaire de NAD⁺/NADH, un effondrement des réserves d'ATP, et, par conséquent, la mort cellulaire (*Ferrari et al., 2004*).

Les radicaux (ROS et RNS) dégradant directement les protéines et l'ADN de la mitochondrie, altèrent le métabolisme énergétique. Par exemple, le peroxy-nitrite, connu comme agent oxydant et nitrosylant puissant, peut inactiver tous les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (*Brown et Borutaite, 2001*).

II.4.c. Rôle physiologique des radicaux dans la signalisation cellulaire

Il est maintenant bien établi que les radicaux d'oxygène et d'azote jouent un rôle physiologique important dans la signalisation cellulaire, et en particulier dans les processus de protection. De nombreuses études ont montré l'implication des radicaux dans l'activation de protéine kinases C (PKC). En effet, alors qu'une élévation modérée de radicaux est capable de diminuer la mort cellulaire, l'inhibition des PKC abolit cette protection (*Zhang et al., 2002; Lebuffe et al., 2003*). Il semble également que la protection myocardique post-ischémique par des anesthésiques comme le sévoflurane soit liée à une production accrue de radicaux, via une translocation des PKC vers la membrane plasmique (*Bouwman et al., 2004*).

Dans un modèle de cardiomyocytes isolés, la protéine kinase B (PKB) peut être phosphorylée suite à l'application de peroxyde d'hydrogène (*Pham et al., 2000*), indiquant que la voie des PI3 kinases peut également être activée par les radicaux.

Il a été montré que les radicaux libres tels que H₂O₂ pouvaient promouvoir la phosphorylation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), ERK et p38 (*Snabaitis et al., 2002; Yue et al., 2002*) et que cette phosphorylation est inhibée par des piègeur de radicaux

(Yue et al., 2002; Kimura et al., 2005) ou des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kulisz et al., 2002).

Le monoxyde d'azote peut également être impliqué dans certaines voies de signalisation cellulaire. Ainsi le NO peut activer des voies dépendantes du GMPc (Guanidine MonoPhosphate cyclique), dérivé de la guanylate cyclase (Mery et al., 1993; Baker et al., 2001), réguler la réponse adrénergiques via une voie dépendante du GMPc (Balligand, 1999), activer les PKC (Harada et al., 2004), moduler le couplage excitation-contraction (Hare, 2003), moduler les courants calciques (Mery et al., 1993; Massion et al., 2003), ou encore activer les canaux potassiques dépendant de l'ATP (K_{ATP}) (Sasaki et al., 2000; Lebuffe et al., 2003).

Enfin, l'activation des PKC et des MAPK a été observée essentiellement dans des protocoles de cardioprotection dans lesquels une augmentation de production radicalaire s'avère bénéfique.

III. La cardioprotection

Les différents protocoles de protection du myocarde contre les dérèglements fonctionnels et les changements structuraux provoqués par l'ischémie et la reperfusion sont indiqués sur la figure 6.

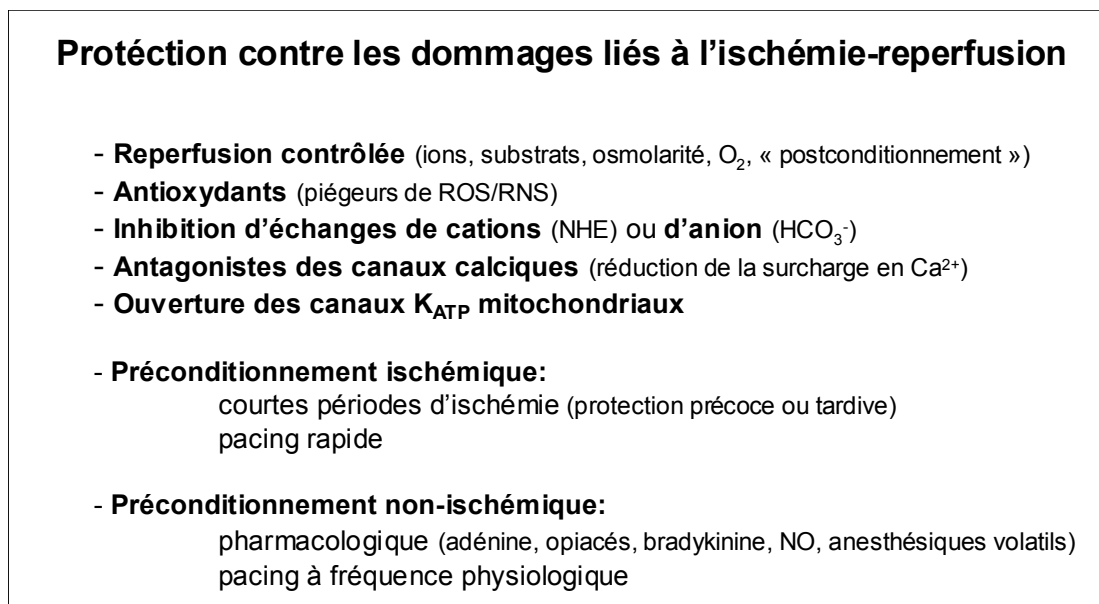


Figure 6 : Différents protocoles permettent de limiter les dommages causés par l'ischémie-reperfusion.

III.1. Le préconditionnement ischémique

En 1986, Murry et coll. (Murry et al., 1986) ont découvert que de brefs épisodes d'ischémie, n'entraînant pas de lésions irréversibles, suivis par des épisodes de reperfusion pouvaient rendre le myocarde résistant contre une ischémie prolongée survenant ultérieurement. Dans cette étude, l'exposition de cœurs de chien à quatre épisodes d'occlusion coronaire de cinq minutes suivis de cinq minutes de reperfusion diminue la taille d'infarctus et améliore la récupération de la fonction contractile après une ischémie soutenue de 40 minutes.

Depuis, de très nombreuses études ont montré qu'un préconditionnement ischémique (IPC) était possible dans d'autres espèces et sur des types cellulaires différents. Lors de la reperfusion d'un cœur préconditionné, la taille d'infarctus est diminuée (Yue et al., 2002; Nozawa et al., 2003; Hausenloy et al., 2004; Rajesh et al., 2004), la récupération de la fonction contractile est améliorée (Babsky et al., 2002; Ala-Rami et al., 2003; Jain et al., 2003; Khaliulin et al., 2004; Rajesh et al., 2004; Wakahara et al., 2004) et l'incidence des arythmies est diminuée (Ala-Rami et al., 2003; Driamov et al., 2004; Rajesh et al., 2004).

La protection apportée par ce protocole est double, d'abord à court terme (2 à 4h, première fenêtre de protection) et ensuite à long terme, 24h plus tard (seconde fenêtre de protection).

La protection lors de cette phase dite tardive peut durer jusqu'à 72h (Cohen et al., 2000).

Durant un bref épisode d'ischémie, comme lors du préconditionnement ischémique, le myocarde libère de l'adénosine, de la bradykinine et de la noradrénaline. Afin de démontrer l'implication de ces molécules dans l'IPC, des protocoles de préconditionnement pharmacologique ont été développés.

III.2. Le préconditionnement pharmacologique

III.2.a. L'adénosine

Il est bien connu que le myocarde ischémique dégrade rapidement l'ATP en adénosine. Afin de tester l'implication de ce métabolite dans le phénomène de préconditionnement, des agonistes ou antagonistes des récepteurs à l'adénosine ont été

utilisés. Il en résulte que le prétraitement par l'adénosine (*Vanden Hoek et al., 2000; Wakeno-Takahashi et al., 2004*) ou un agoniste des récepteurs A1 (*Hausenloy et al., 2004*) protège la fonction contractile et réduit la taille de l'infarctus.

III.2.b. La bradykinine

L'utilisation d'HOE 140, un antagoniste des récepteurs B2 à la bradykinine bloque l'effet protecteur de l'IPC. En parallèle, la bradykinine mime l'effet du préconditionnement ischémique (*Driamov et al., 2004*).

III.2.c. Les opiacés

Le traitement de cardiomyocytes ventriculaires isolés d'embryon de poulet durant 10 minutes par un agoniste des récepteurs δ des opiacés suivies de 10 minutes de lavage diminue la mort cellulaire et améliore la contraction durant une ischémie-reperfusion (*Zhang et al., 2002*). Sur un modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde chez le rat, la morphine aboutit à une réduction de taille d'infarctus comparable à celle obtenue avec l'IPC (*Schultz et al., 1996*). Cet effet est bloqué par un antagoniste non sélectif des récepteurs aux opiacés.

III.3. *Autres traitements cardioprotecteurs*

D'autres protocoles ont été développés afin d'améliorer la récupération post-ischémique du myocarde. L'acétylcholine (*Yao et al., 1999*), les anesthésiques volatils (*Bouwman et al., 2004; Wakeno-Takahashi et al., 2004; Weber et al., 2005*), les antagonistes calciques (*Tenthorey et al., 1998; Wang et al., 2004a*), l'endothéline (*Gourine et al., 2005*), l'érythropoïétine (*Lipsic et al., 2004*), la cytokine TNF α (*Lecour et al., 2005*), l'ouverture des canaux K_{ATP} sarcolemmiques et/ou mitochondriaux (*Dos Santos et al., 2002; Das et Sarkar, 2003a*) ou l'hypoxie chronique (*Vanden Hoek et al., 2000; Ladilov et al., 2002; Fitzpatrick et al., 2005*) permettent une protection comparable à celle obtenue par le préconditionnement ischémique classique. L'inhibition d'échangeurs ioniques tels que le NHE (*Meiltz et al., 1998; Javadov et al., 2005; Park et al., 2005; Yamada et al., 2005*), le NO endogène (*Shiono et al., 2002*) ou exogène (*Nakano et al., 2000*), les antioxydants (*Shite et al., 2001*) peuvent également

protéger le myocarde contre l'I/R. Enfin, pendant la reperfusion elle-même, de brèves périodes d'ischémie (Tsang et al., 2004; Serviddio et al., 2005) limitent aussi les dommages dus à la reperfusion, phénomène appelé *postconditionnement*.

III.4. Mécanismes impliqués dans la cardioprotection

III.4.a. Rôle des protéines kinases C (PKC)

Différentes molécules capables de préconditionner le cœur (bradykinine, adénosine, opiacés) se fixent sur des récepteurs couplés à des protéines $G_{i/o}$, aboutissant à l'activation et /ou la transduction des protéines kinases C. Les protéines kinases C (PKC) sont des kinases qui phosphorylent les protéines sur des résidus sérine/thréonine. Il en existe trois catégories, selon leurs propriétés d'activation. Les PKC dites conventionnelles (α , β_I , β_{II} et γ) nécessitent, pour être activées, la présence de calcium, de diacylglycérol (DAG) et de phospholipides. Les PKC dites nouvelles (δ , ϵ , η et θ) ne dépendent pas du calcium pour leur activation. Enfin, les PKC dites atypiques (ζ , ι , λ , et μ) sont indépendantes du calcium, mais également du DAG (Mackay et Mochly-Rosen, 2001).

De nombreuses études ont montrés l'importance des PKC dans plusieurs modèles de cardioprotection. En effet, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un activateur de PKC, en lieu et place du préconditionnement ischémique ou durant l'ischémie-reperfusion, diminue l'apoptose ou la mort cellulaire de la même manière que l'IPC (Liu et al., 2002; Lebuffe et al., 2003). De plus, le préconditionnement ischémique augmente l'activité de la PKC ϵ (Liu et al., 2002). Au contraire le traitement par un inhibiteur non sélectif des PKC au cours du préconditionnement ou durant l'ischémie-reperfusion abolit les effets protecteurs du préconditionnement ischémique (Nakano et al., 2000; Lebuffe et al., 2003; Uchiyama et al., 2003). De courtes périodes d'ischémie, comparables à celles utilisée lors de l'IPC, augmentent le taux de PKC dans la fraction particulaire, attestant d'une translocation des PKC vers la membrane plasmique (Nozawa et al., 2003). Il a également été montré que l'IPC diminuait la déphosphorylation des jonctions communicantes ("Gap junctions"), diminuant

ainsi le ralentissement de la conduction auriculo-ventriculaire observé à la reperfusion (*Jain et al., 2003*). L'inhibition des PKC abolit cet effet protecteur.

Les différentes isoformes de PKC sont également impliquées dans le préconditionnement pharmacologique. En effet, leur inhibition supprime les effets protecteurs d'un agoniste des récepteurs aux opiacés (*Zhang et al., 2002*), d'un antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines (*Yao et al., 2001; Leducq et al., 2003*) ou d'un agoniste des récepteurs adrénergiques β_1 (*Robinet et al., 2005*). Enfin, la diminution de mort cellulaire par un anesthésique (sévoflurane) est accompagnée d'une translocation de la PKC δ vers le sarcolemme, et le blocage de cette translocation par un inhibiteur spécifique (rottlerine) abolit toute protection (*Bouwman et al., 2004*).

Ainsi, les protéines kinases C sont impliquées dans la cardioprotection par l'IPC ou le préconditionnement pharmacologique et ce, dans différents modèles. Les isoformes de PKC impliquées dans cette protection varient selon les modèles, certains groupes ayant montré une implication de la PKC ϵ (*Liu et al., 2002; Nozawa et al., 2003; Li et al., 2004; Weber et al., 2005*), d'autres groupe celle de la PKC δ (*Zhang et al., 2002; Nozawa et al., 2003; Bouwman et al., 2004; Harada et al., 2004*).

III.4.b. Rôle des Tyrosine Kinases

Les tyrosines kinases phosphorylent les protéines sur des résidus tyrosine. Leur rôle dans la cardioprotection, bien que moins étudié que celui des PKC, a été mis en évidence. Par exemple, un inhibiteur non sélectif des tyrosine kinases (génistéine) peut abolir à la fois les effets protecteurs de l'IPC et ceux du préconditionnement pharmacologique (*Pain et al., 2000*).

III.4.c. Rôle des MAPK

Les PKC et les tyrosines kinases sont des composantes d'une cascade de plusieurs kinases. Une des cascades importante et très conservée chez les mammifères est la cascade des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Les MAPK identifiées dans le myocarde sont ERK (Extracellular Regulated Kinase), et les deux kinases activées par le stress, c-Jun N-

terminal Kinase (JNK) et la kinase de 38kDa, p38 MAPK. Chaque MAPK est impliquée dans une voie de signalisation à trois étages : une MAPK kinase kinase (MEKK) qui phosphoryle une MAPK kinase (MKK ou MEK) qui elle-même active une MAPK.

Le préconditionnement par un activateur des canaux K_{ATP} (cf. IV. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP) entraîne une augmentation de la phosphorylation de ERK par rapport à un cœur non-préconditionné (*Samavati et al., 2002*). D'autre part, l'effet protecteur d'un donneur de NO peut être bloqué par l'inhibition de ERK (*Xu et al., 2004*). L'implication de ERK dans la protection a également été démontrée dans un modèle transgénique : la récupération de la fonction contractile suite à une ischémie de cœurs de souris transgéniques présentant un niveau élevé de la forme phosphorylée de ERK est meilleure que celle de leurs congénères sauvages. Un inhibiteur de MEK, la kinase qui phosphoryle ERK abolit ces différences (*Seubert et al., 2004*).

JNK semble également impliqué dans la cardioprotection. En effet, l'inhibition de JNK diminue l'apoptose de cardiomyocytes à la reperfusion (*Hreniuk et al., 2001; Ferrandi et al., 2004*) et réduit la taille de l'infarctus chez le rat (*Ferrandi et al., 2004*).

D'autre part l'implication de p38 MAPK a été démontrée dans différents modèles mais les résultats sont contradictoires. Dans un modèle de ligature coronaire *in vivo* chez le rat, l'activité de p38 MAPK est augmentée à la reperfusion, alors que l'inhibition de p38 MAPK diminue la taille de l'infarctus (*Gao et al., 2002*). Au contraire, une étude d'infarctus du myocarde chez le porc a montré que l'effet protecteur des préconditionnements ischémique et pharmacologique était aboli par deux inhibiteurs différents de p38 MAPK (*Schulz et al., 2002*). Le prétraitement d'un cœur de rat isolé par un activateur de p38 MAPK mime la protection induite par le préconditionnement ischémique, cet effet étant aboli par un inhibiteur de p38 MAPK (*Yue et al., 2002*). Dans ces modèles expérimentaux, l'activation de p38 MAPK semble être nécessaire au préconditionnement ischémique.

Ainsi, les MAPK semblent jouer un rôle important dans les voies de transduction impliquées dans le préconditionnement ischémique. Il a été observé que l'activation des MAPK peut résulter de l'activation des PKC, souvent associée à une production accrue de ROS et/ou RNS (*Cohen et al., 2000*).

III.4.d. Rôle des radicaux, ROS et RNS

Les radicaux d'oxygène produits lors de la reperfusion ont des effets néfastes sur la fonction contractile, qui peuvent être diminués par l'ajout de SOD, de catalase (*Temsah et al., 1999*), d'allopurinol, d'inhibiteur de la xanthine oxydase ou de vitamine C (*Saavedra et al., 2002*). De plus, le peroxyde d'hydrogène augmente l'apoptose de cardiomyocytes néonataux de rat (*Ichinose et al., 2003*).

Au contraire, Lebuffe et ses collaborateurs ont montré que les radicaux d'oxygène étaient indispensables à la cardioprotection. Le traitement de cardiomyocytes embryonnaire par le peroxyde d'hydrogène apporte la même protection que l'IPC (*Lebuffe et al., 2003*). De plus, les piègeurs de radicaux (2-N-mercapto-propionyl-glycine (MPG) ou ebselen), abolissent l'effet protecteur du diazoxide, un activateur des canaux potassiques mitochondriaux sensibles à l'ATP (mitoK_{ATP}). Le diazoxide mime l'effet du préconditionnement ischémique (*Pain et al., 2000; Lebuffe et al., 2003; Hausenloy et al., 2004; Mizukami et al., 2004*).

Le piègeur de radicaux MPG est également capable de bloquer la protection apportée par l'IPC (*Tang et al., 2002; Hausenloy et al., 2004*), l'acétylcholine (*Yao et al., 1999*), un antagoniste des récepteurs aux benzodiazépines (*Yao et al., 2001*), un antagoniste des canaux calciques (*Wang et al., 2004a*), le TNF α (*Lecour et al., 2005*) ou encore un agoniste des récepteurs aux opiacés (*Zhang et al., 2002*).

De plus, des souris transgéniques invalidées en sous-unité gp91^{phox} de la NAD(P)H oxydase ne peuvent pas être préconditionnées, par manque de production radicalaire. En effet, la production radicalaire induite par l'IPC est absente chez ces souris et est comparable à celle observée chez les souris sauvages préconditionnées traitées par l'antioxydant MPG (*Bell, 2004*).

Les radicaux d'azote semblent également être importants dans la protection du myocarde. En effet, un donneur de NO (SNAP) mime les effets du préconditionnement (*Nakano et al., 2000*), alors qu'un inhibiteur non-sélectif des NOS (L-NAME) est capable de bloquer ce dernier (*Lebuffe et al., 2003*).

Cependant, certaines études montrent au contraire qu'une diminution de production radicalaire est bénéfique. Ainsi, le préconditionnement hypoxique diminuerait la production de ROS à la réoxygénation, et diminuerait la mort cellulaire (*Vanden Hoek et al., 2000*). D'autres études montrent qu'une diminution de production radicalaire lors de la réoxygénation est bénéfique (*Ozcan et al., 2002; Dzeja et al., 2003; Ferranti et al., 2003*).

Il semble donc que la production radicalaire soit nécessaire à la cardioprotection. Les préconditionnements ischémique et pharmacologique augmentent la production de ROS, et cette production accrue semble être bénéfique. Le préconditionnement ischémique ou pharmacologique, implique aussi les canaux potassiques sensibles à l'ATP, et leur état d'activation module fortement la production de ROS/RNS.

IV. Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP})

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}) sont des canaux "K⁺ inward-rectifying" qui sont inhibés par l'ATP et activés par les nucléotides diphosphates (ADP, GDP). Ils furent découverts par Noma en 1983 dans la membrane externe des cellules musculaires cardiaques (*Noma, 1983*). Ces canaux furent ensuite identifiés dans nombre de tissus, comme les cellules β -pancréatiques, le système nerveux central, les muscles lisses, les muscles striés et les cellules des tubules rénaux (*Fujita et Kurachi, 2000*). Les canaux K_{ATP} furent également identifiés sur la membrane interne des mitochondries (*Inoue et al., 1991*) et furent dénommés canaux potassiques mitochondriaux sensibles à l'ATP (**mito** K_{ATP}). Les canaux K_{ATP} présents sur le sarcolemme sont donc devenus les canaux potassiques sarcolemmiques sensibles à l'ATP (**sarc** K_{ATP}). Enfin il existe un canal K_{ATP} au niveau du noyau, dont la structure n'est pas encore connue mais qui aurait des propriétés proches de celles du canal sarcolemmique (*Zhuo et al., 2005*). Le blocage de ces canaux K_{ATP} nucléaires augmenterait le potentiel transmembranaire du noyau, ce qui conduirait à une libération de calcium à partir du noyau. Ce signal calcique nucléaire pourrait aboutir à une phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) et moduler l'expression génique.

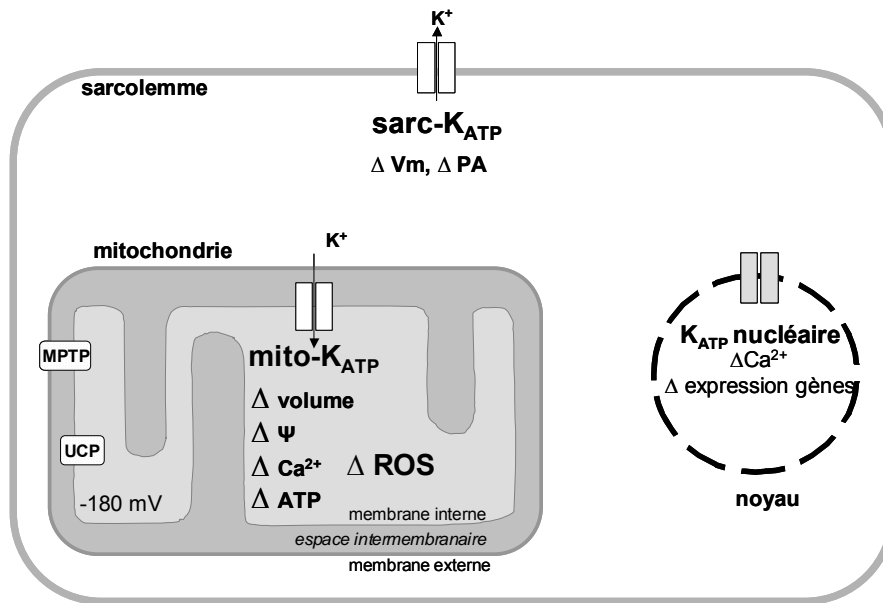


Figure 7 : Les canaux K_{ATP} sont présents dans la membrane sarcoplasmique ($sarcK_{ATP}$), dans la membrane interne de la mitochondrie ($mitoK_{ATP}$) et dans la membrane nucléaire. Les canaux $sarcK_{ATP}$ modulent le potentiel de membrane (V_m) et la durée du potentiel d'action (PA), les canaux $mitoK_{ATP}$ modulent le potentiel de membrane ($\Delta\psi$), le volume, et les concentrations d'ATP et de calcium dans la mitochondrie. Enfin, le canal nucléaire est responsable du contrôle de la concentration calcique et de l'expression génique. Δ : variation ; MPTP : pore mitochondrial de perméabilité transitoire ; UCP : protéine découplant.

IV.1. Structure et fonction des canaux K_{ATP} sarcolemmiques ($sarcK_{ATP}$)

Noma a défini ce canal à partir d'une étude électrophysiologique. Ainsi, l'épuisement en ATP de cardiomyocytes de rat et de cochon d'Inde révèle un courant non visible en présence de glucose, dû à un canal unique. La conductance de ce canal est de 21 pS en présence de 5,4 mM K^+ (patch en cellule attachée). Le potentiel d'inversion de ce canal est proche du potentiel d'équilibre du potassium, indiquant la présence d'un canal potassique inconnu. De plus, l'application d'ATP sur la surface interne de la membrane diminue fortement le courant mesuré, cet effet pouvant être inversé facilement. Ces données indiquent que ce canal doit être régulé par l'ATP intracellulaire, être clos quand la cellule a un métabolisme de repos, c'est-à-dire lorsque la concentration en ATP est élevée (Noma, 1983).

La structure moléculaire du canal sarcK_{ATP} a depuis été bien étudiée et est clairement définie.

Ce canal est une structure octamérique constituée de quatre sous-unités Kir 6.x (K⁺ inward rectifying) et de quatre sous-unités SUR (récepteur aux sulfonyles) (Figure 8). Les sous-unités Kir possèdent deux segments transmembranaires, et leur association en tétramère forme le pore. Leur structure ressemble à celle des deux derniers domaines transmembranaires de la partie C-terminale du canal potassique voltage dépendant (Kv), mais ne possède pas de partie sensible au voltage, et y est donc insensible (Fujita et Kurachi, 2000). Il semblerait que l'ATP puisse se lier directement sur les sous-unités Kir et ainsi fermer le pore (Enkvetchakul et Nichols, 2003). Il existe deux sous-unités Kir pouvant former un canal K_{ATP}: Kir 6.1 et Kir 6.2.

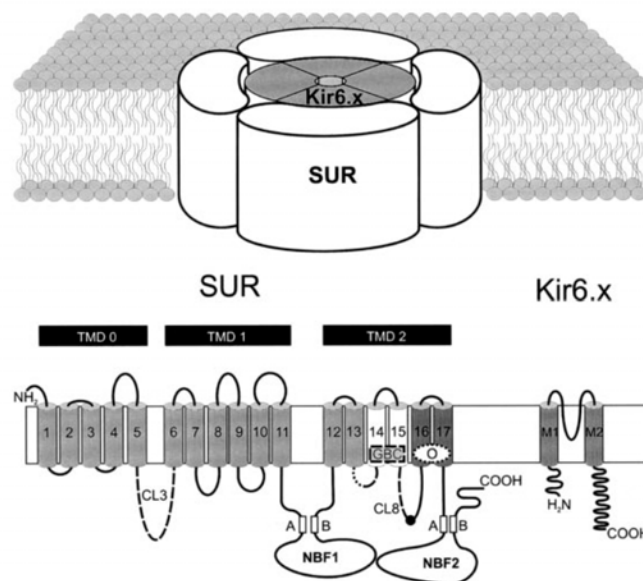


Figure 8 : Structure des canaux K_{ATP} et leurs sous-unités. CL : boucle cytosolique, NBF : site de liaison des nucléotides (Quast et al., 2004).

Les sous-unités SUR sont les sous-unités régulatrices. Elles sont constituées de 17 segments transmembranaires, groupés en 3 domaines transmembranaires (TMD)(Zaugg et Schaub, 2003), et deux domaines de liaison aux nucléotides (NBF). Le récepteur aux sulfonyles est un membre de la famille des transporteurs de cassette de liaison à l'ATP (ATP binding cassette, ABC). Bien qu'il possède tous les domaines nécessaires pour le

transport, SUR est un transporteur ABC sans activité de transport. Il semblerait que sa seule activité soit de réguler l'ouverture et la fermeture du canal K_{ATP} (Moreau et al., 2005). Cependant, une activité ATPasique de ces sous-unités a pu être démontrée et jouerait un rôle dans la régulation du canal K_{ATP} (Bienengraeber et al., 2000). En effet, cette activité ATPasique est dépendante de la concentration intracellulaire en ATP, et est inhibée en absence de magnésium. De plus, les activateurs de canaux potassiques augmentent l'activité ATPasique des SUR, et l'ouverture du canal. Mais cet effet est inexistant si l'ADP, produit par l'hydrolyse de l'ATP, est utilisé par la créatine kinase. La régulation par les SUR dépend donc de l'équilibre des concentrations respectives d'ATP et d'ADP. Il existe trois isoformes de récepteurs aux sulfonylurées, codées par deux gènes différents : SUR1 et SUR2, ce dernier pouvant être épissé en SUR2A et SUR2B.

Les canaux $sarK_{ATP}$ sont donc constitués de 4 sous-unités Kir 6.x identiques et de 4 sous-unités SUR identiques. La composition moléculaire exacte des canaux $sarK_{ATP}$, et par conséquent leur régulation, varie selon les organes. Ainsi, dans les cellules β pancréatiques, les canaux $sarK_{ATP}$ sont constituées des sous-unités régulatrices SUR1 et des sous-unités Kir 6.2. Les canaux $sarK_{ATP}$ sont constitués de SUR2A et Kir 6.2 dans les myocytes cardiaques et squelettiques, et de SUR2B et Kir 6.1 dans le muscle lisse vasculaires, et de SUR2B et Kir 6.2 dans les muscles lisses non vasculaires (Zhuo et al., 2005).

Dans le pancréas, les canaux $sarK_{ATP}$ sont impliqués dans la régulation de la libération d'insuline. En effet, le glucose entre dans les cellules β du pancréas par les transporteurs Glut2. La glycolyse et le métabolisme mitochondrial vont aboutir à une augmentation de la concentration d'ATP intracellulaire et un changement du rapport ATP/ADP. Ces changements vont conduire à la fermeture des canaux $sarK_{ATP}$. Il en découle une dépolarisation qui va permettre une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de calcium va entraîner une exocytose des granules d'insuline (Quast et al., 2004; Tarasov et al., 2004). Les sulfonylurées, tels que le glibenclamide ou le tolbutamide sont d'ailleurs des antidiabétiques qui bloquent les canaux $sarK_{ATP}$, et ainsi stimulent la sécrétion d'insuline.

Les sarcK_{ATP} sont également impliqués dans l'assimilation du glucose dans les muscles squelettiques, de l'excitabilité des neurones et des muscles squelettique et cardiaque, et dans le recyclage du potassium dans l'épithélium rénal (*Zaugg et Schaub, 2003*).

Au niveau cardiaque, l'ouverture des canaux sarcK_{ATP} conduit au raccourcissement de la dépolarisation. Le raccourcissement du potentiel d'action a longtemps été une hypothèse pour expliquer l'effet protecteur de l'ouverture des canaux K_{ATP}, mais cette hypothèse est maintenant fortement débattue et controversée.

IV.2. Pharmacologie des canaux K_{ATP}

Du fait de leur structure variée, les canaux sarcK_{ATP} des divers organes possèdent des affinités différentes pour les activateurs et inhibiteurs connus (Figure 9). Ainsi, les canaux K_{ATP} du plasmalemme des cellules β pancréatiques peuvent être activés par le diazoxide (EC₅₀ = 20-100μM), mais peu par le pinacidil (EC₅₀ > 500μM). Au contraire, dans le cœur, le pinacidil permet l'ouverture des canaux sarcK_{ATP} (EC₅₀ = 10-30μM), alors que le diazoxide en est incapable. Enfin, les deux agents sont capables d'ouvrir les canaux de la musculature lisse (EC₅₀ = 0,5μM pour le pinacidil et 40μM pour le diazoxide ; *Fujita et Kurachi, 2000*). Ainsi, le diazoxide est le seul activateur des canaux K_{ATP} capable de se lier aux sous-unités SUR1, présents sur les cellules β du pancréas mais n'a pas d'effet sur les SUR2A présents dans le cœur. Sa liaison est également possible sur les SUR2B des muscles lisses, et explique son effet antihypertenseur (*Moreau et al., 2005*). Les propriétés des canaux sarcK_{ATP} peuvent même varier dans le même organe. Ainsi, Poitry et coll. ont démontré que l'EC₅₀ pour le diazoxide était plus faible dans l'oreillette que dans le ventricule (EC₅₀ = 0,13μM et 3,1μM, respectivement). Les cardiomyocytes auriculaires "patchés" en présence d'un protonophore sont capables de répondre au diazoxide (EC₅₀ = 129μM) alors que les myocytes ventriculaires ne le sont pas (EC₅₀>2500μM ; *Poitry et al., 2003*). Enfin, nicorandil et cromakalim activent à la fois les canaux K_{ATP} sarcolemmiques et mitochondriaux (*Moreau et al., 2005*).

Les sulfonylurées, dont le glibenclamide et le tolbutamide, bloquent les canaux K_{ATP} des cellules pancréatiques, avec une IC_{50} de 5 à 30nM et 5 à 20nM, respectivement. Le blocage de récepteurs cardiaques nécessite 5nM de glibenclamide, mais 400 μ M de tolbutamide sont nécessaires pour le même effet. Ces substances sont non-sélectives, et bloquent les canaux sarc- et mito K_{ATP} . Par contre, le HMR 1098 (Aventis) est un inhibiteur sélectif des K_{ATP} sarcolemmiques.

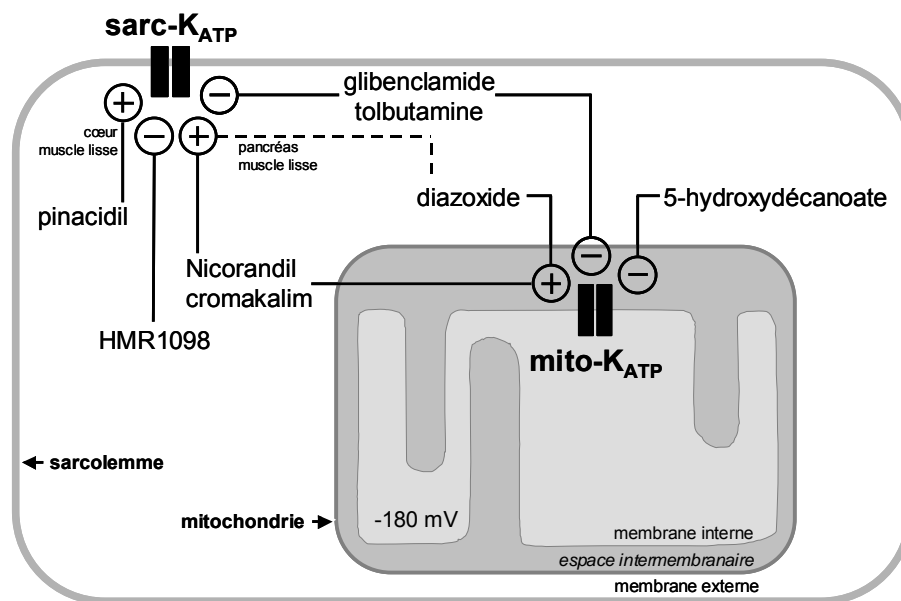


Figure 9 : Pharmacologie des canaux K_{ATP} mitochondriaux et sarcolemmiques. L'activation des canaux est symbolisée par un +, l'inhibition par un -.

IV.3. Structure et fonction des canaux K_{ATP} mitochondriaux (mito K_{ATP})

Les canaux K_{ATP} mitochondriaux ont été découverts en 1991 par Inoue (*Inoue et al., 1991*). De nombreuses études ont permis de caractériser la structure et la fonction de ces canaux, mais leur clonage n'a toujours pas été réalisé.

IV.3.a. Evidences supportant l'existence des canaux mito K_{ATP}

- *Enregistrements électrophysiologiques de l'activité du canal mitochondrial*

En 1991, Inoue et coll. réalisèrent du patch clamp sur des mitoplastes (mitochondries dégagées de leur membrane externe) préparées à partir de mitochondries de foie. Un courant potassique fut identifié, et inhibé par l'application d'ATP du côté matriciel de la membrane. Ce courant est également bloqué par l'inhibiteur de canaux potassique, 4-aminopyridine. De plus, les propriétés du canal ressemblent à celles du canal sarcK_{ATP}, avec une conductance de 10pS (100 mM K⁺ cytosolique, et 33 mM K⁺ matriciel). Ce canal est en plus inhibé par le sulfonyleurée glibenclamide (*Inoue et al., 1991*).

Les études suivantes furent réalisées sur des membranes ou bicouches lipidiques reconstituées à partir de mitochondries purifiées. Ainsi, dans des bicouches lipidiques, l'ajout d'ATP lié au magnésium (MgATP) diminue fortement la conductance du canal (*Grigoriev et al., 1999*). Zhang et coll. ont observé une activité K⁺-sélective sur des bicouches lipidiques reconstituées à partir de cœur de bœuf (*Zhang et al., 2001*). De nouveau, un courant potassique a été révélé. Les canaux sont inactivés de manière dose-dépendante par le MgATP appliqué du côté correspondant à la matrice mitochondriale, mais pas lorsque l'ATP est appliqué du côté cytosolique. De plus, le blocage sélectif des canaux mitoK_{ATP} par le 5-hydroxydécanoate (5-HD) inactive le courant K⁺. Le glibenclamide, antagoniste non-sélectif des canaux K_{ATP}, a le même effet et ces canaux sont réactivés par le diazoxide. L'antagoniste sélectif des canaux sarcK_{ATP}, le HMR-1098 n'a aucun effet (*Zhang et al., 2001*).

L'effet des radicaux a également été étudié. L'addition de xanthine/xanthine oxydase, producteur de O₂^{•-} côté *cis* entraîne une activation rapide des canaux et cet effet est aboli par le 5-HD (*Zhang et al., 2001*). Ces résultats sont en accord avec ceux de Grigoriev et coll. qui ont observé qu'un donneur d'électrons activait le canal, alors qu'un accepteur d'électrons le désactivait (*Grigoriev et al., 1999*).

- **Mesure du flux K⁺ mitochondrial**

Dans leur travaux, Garlid et coll. (*Paucek et al., 1992; Garlid et al., 1996; Paucek et al., 1996; Garlid et al., 1997; Yarov-Yarovoy et al., 1997*) ont mesuré le flux de K⁺ dans des protéoliposomes reconstitués à partir de mitochondries de foie de rat, et l'ont comparé à celui de protéoliposomes contenant les canaux sarcK_{ATP} de cœur de boeuf. Le diazoxide

active 2000 fois plus le canal mitochondrial que le canal sarcolemmique ($K_{1/2}$ 0,4 μ M et $K_{1/2}$ 855 μ M respectivement). D'autres activateurs des canaux K_{ATP} (cromakalim et EMD60480) augmente le flux potassique sur des protéoliposomes. Des résultats comparables ont été observés avec des mitochondries intactes. Cependant, parmi les activateurs de canaux K_{ATP} , seul le diazoxide montre une forte différence d'affinité entre les deux types de canaux (Garlid et al., 1996).

- **Identification des sous-unités**

De nombreuses études ont tenté d'identifier et de localiser les différentes sous-unités Kir et SUR composant le canal K_{ATP} mitochondrial. Ainsi Suzuki et coll. ont examiné la localisation de Kir6.1 dans des cellules de muscle et de foie de rat. Des anticorps anti-Kir6.1 ont reconnu une bande de 51 kDa dans les deux tissus, cette bande étant beaucoup plus intense dans la fraction mitochondriale. De plus, le marquage de coupe de tissu démontrait une co-localisation de Kir6.1 et de la sous-unité IV de la cytochrome C oxydase, marqueur mitochondrial. Ce marquage a été confirmé par marquage immunogold : des particules d'or se retrouvent bien au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Suzuki et al., 1997). De même, Zhou et coll. ont localisé la sous-unité Kir6.1 dans la membrane interne de mitochondries du système nerveux central (Zhou et al., 1999). Les sous-unités Kir6.1 furent également trouvées dans des cardiomyocytes ventriculaires de rat, alors qu'aucune sous-unité SUR n'a été identifiée (Singh et al., 2003).

Enfin, Lacza et coll. ont démontré dans des neurones (Lacza et al., 2003a) et dans des cardiomyocytes (Lacza et al., 2003b) la présence à la fois de Kir6.1 et de SUR. En effet, Kir6.1 est présente dans les cellules, et est enrichie dans la fraction mitochondriale. Dans les neurones, SUR 2 a également été localisée dans la membrane interne des mitochondries. Dans les cardiomyocytes, une bande est reconnue par les anticorps anti-SUR2, est enrichie dans les mitochondries, mais ne correspond pas à la taille attendue de SUR2. Aussi, les auteurs pensent que cette protéine est un épissage de SUR2. En effet, il existe une séquence de transfert entre les acides aminés 232 et 238 mais pas en N-terminal de la protéine. De plus, dans les deux types cellulaires testés, le glibenclamide diminue la fluorescence du

MitoFluorRed. Cet effet est inversé par le diazoxide, indiquant que le canal mitoK_{ATP} est fonctionnel.

Alors que le marquage Kir6.1 est positif au niveau de la mitochondrie, la transfection des cellules avec un dominant négatif de Kir6.1 n'a pas d'effet sur la modulation du potentiel redox de la matrice mitochondriale par le diazoxide. Les auteurs en déduisent donc que Kir6.1 ne participe pas à la structure du canal mitoK_{ATP} (*Seharaseyon et al., 2000*). Récemment, il a été montré, à partir de mitochondries de foie de rat, qu'un complexe multi-protéique contenant la succinate déshydrogénase conférait une activité de transport de potassium (*Ardehali et al., 2004*).

Bien qu'il n'y ait pas, jusqu'à ce jour, de consensus sur la composition des canaux mitoK_{ATP}, il semble ressortir de ces études 1) qu'il existe un canal fonctionnel sur la mitochondrie qui module la fonction et le potentiel mitochondriaux, 2) que ce canal est modulé par l'ATP, les activateurs des canaux K_{ATP}, et bloqué par le glibenclamide et le 5-HD et, 3) que Kir6.1 semble être une composante de ce canal, alors qu'aucune sous-unité SUR connue n'ait pu être formellement identifiée, ou le canal cloné.

IV.3.b. Fonction des canaux mitoK_{ATP}

En cas d'épuisement en ATP lors de l'ischémie, l'activation des canaux mitoK_{ATP} semble découpler partiellement la chaîne respiratoire et accélérer le transport des électrons, maintenant ainsi les transporteurs proximaux d'électrons (Complexes I à III) dans un état oxydé. Cela pourrait favoriser la synthèse d'ATP dès que les conditions cellulaires redeviennent favorables (*Zhuo et al., 2005*).

IV.4. Canaux K_{ATP} et cardioprotection

L'implication des canaux K_{ATP} dans le préconditionnement ischémique a pu être mis en évidence grâce à l'utilisation de bloqueurs des canaux K_{ATP}. En effet, l'inhibiteur non-sélectif, glibenclamide ou l'inhibiteur sélectif des canaux mitoK_{ATP}, le 5-HD abolissent la protection procurée par le préconditionnement ischémique (*Pain et al., 2000; Driamov et al.,*

2004). Les deux composés sont capables de bloquer l'effet protecteur de l'IPC (*Pain et al., 2000*), mais le 5-HD suffit à abolir la protection cardiaque (*Fryer et al., 2000; Vanden Hoek et al., 2000; Minners et al., 2001; Lebuffe et al., 2003*).

De nombreuses études ont montré que les activateurs des canaux K_{ATP} pouvaient mimer l'effet du préconditionnement ischémique (*Ala-Rami et al., 2003; Das et Sarkar, 2003b; Das et Sarkar, 2003a; Feng et al., 2003; Gross et al., 2003*). Les agents utilisés, nicorandil et pinacidil, entraînent également une diminution de la durée du potentiel d'action. Cet effet a longtemps été considéré comme étant responsable de l'amélioration fonctionnelle (antiarythmique) due à l'ouverture des canaux K_{ATP} (*Cohen et al., 2000; Garlid et al., 2003*). Cependant, le diazoxide, qui n'entraîne pas de raccourcissement de la durée du potentiel d'action, apporte une protection contre l'ischémie-reperfusion. Dès lors, des doutes apparaissaient quant à l'hypothèse d'une protection due au raccourcissement du potentiel d'action cardiaque.

Les effets protecteurs des préconditionnements ischémique (*Fryer et al., 2000*) et pharmacologique induit par l'adénosine (*Wakeno-Takahashi et al., 2004*), le NO (*Xu et al., 2004*) ou un anesthésique volatil (sévoflurane) (*Bouwman et al., 2004*) sont abolis par l'inhibition des canaux $mitoK_{ATP}$. Ce blocage abolit également la protection procurée par l'hypoxie chronique (*Fitzpatrick et al., 2005*), et supprime la seconde fenêtre de protection (*Ockaili et al., 1999*).

La protection par ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ nécessite, comme l'IPC, une augmentation de la production de radicaux. En effet, le prétraitement, avant l'ischémie, par le diazoxide ou d'autres activateurs des canaux K_{ATP} , augmente la production de radicaux (*Carroll et al., 2001; Forbes et al., 2001; Krenz et al., 2002; Samavati et al., 2002; Oldenburg et al., 2003*), mais diminue la production radicalaire à la réoxygénation (*Ozcan et al., 2002; Ferranti et al., 2003*). Un piègeur de radicaux, tel que le MPG, abolit la protection par le diazoxide (*Carroll et al., 2001; Krenz et al., 2002; Eaton et al., 2005*). Il en est de même pour le 5-HD (*Carroll et al., 2001; Minners et al., 2001; Tsuchida et al., 2002*), confirmant le rôle important des canaux mitochondriaux et non celui des canaux du sarcolemme. L'ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ peut donc être utilisée comme préconditionnement pharmacologique. Cette protection est

non seulement possible par l'application d'activateurs des canaux K_{ATP} avant et durant l'ischémie (Murata et al., 2001; Moon et al., 2004), mais aussi tout au long du protocole d'ischémie-reperfusion (Dos Santos et al., 2002; Das et Sarkar, 2003b).

Durant l'ischémie, l'ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ diminue la chute de concentration d'ATP (Rousou et al., 2004; Wakahara et al., 2004), préserve le potentiel mitochondrial (Eliseev et al., 2004) et diminue la surcharge calcique (Murata et al., 2001; Rousou et al., 2004; Eaton et al., 2005).

Ainsi, un des mécanisme proposé pour expliquer la protection apportée par l'ouverture des canaux $mitoK_{ATP}$ est le suivant : l'entrée de potassium dans la mitochondrie, consécutive à l'ouverture des canaux K_{ATP} en normoxie, entraîne un gonflement et une alcalinisation de la matrice mitochondriale. Cette augmentation de potassium va augmenter la production radicalaire (le mécanisme de cette production n'est actuellement pas connu). Les radicaux ainsi produits vont pouvoir activer certaines kinases impliquées dans des voies de signalisation intracellulaires protectrices (cf. II.4.c. Rôle physiologique des radicaux dans la signalisation cellulaire).

Durant l'ischémie, l'activation constante des canaux $mitoK_{ATP}$ permet de compenser la diminution d'entrée d'ion K^+ dans la mitochondrie, et donc d'éviter la contraction de la matrice mitochondriale. Ce phénomène permettrait ainsi de maintenir en contact la créatine kinase mitochondriale (Mi-CK), le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et le transporteur d'ATP/ADP (ANT) (Garlid, 2000; Dos Santos et al., 2002). Le maintien de cette structure supramoléculaire permettrait de limiter les pertes de nucléotides (adénines nucléotides et ADP), qui sont utilisés à la reperfusion.

Le rôle des canaux $sarcK_{ATP}$ dans l'ischémie-reperfusion a été réexaminé par l'utilisation de souris invalidées en sous-unité Kir6.2 (KO Kir6.2), formant le canal $sarcK_{ATP}$ cardiaque (Suzuki et al., 2003). La contracture est plus grande durant l'ischémie et la récupération des souris KO est ralentie à la reperfusion. Ces résultats diffèrent beaucoup de ceux trouvés chez les souris sauvages et ressemblent à l'effet du blocage des canaux $sarcK_{ATP}$ par le HMR 1098. Ceci suggère une implication importante des canaux $sarcK_{ATP}$ chez la

souris. Cependant, le HMR1098 n'a pas d'effet chez le rat (*Fryer et al., 2000*), ou le chien (*Vereckei et al., 2004*). L'effet observé chez la souris pourrait être dû à une dépendance plus grande vis-à-vis des canaux sarcK_{ATP} pour moduler la durée du potentiel d'action du fait de la fréquence cardiaque très élevée dans le modèle murin (environ 350-500 bpm au repos et jusqu'à 800 bpm sous stress) (*O'Rourke, 2004*).

Ainsi, l'implication des canaux K_{ATP} dans la protection cardiaque fait l'unanimité. Cependant, en l'absence de preuves directes par clonage des canaux K_{ATP} mitochondriaux, certains auteurs doutent de l'existence et donc de l'implication de ces canaux dans la cardioprotection (*Hanley et Daut, 2005*). De nombreuses études ont pu montrer, par l'utilisation du diazoxide et du 5-HD, l'implication des canaux mitoK_{ATP} dans la cardioprotection. Néanmoins, ces deux substances pourraient avoir des effets non-spécifiques. Le diazoxide inhiberait la succinate déshydrogénase (SDH), alors que le 5-HD interagirait avec l'oxydation des acides gras (*O'Rourke, 2004*). Mais les effets du diazoxide sur la SDH ne semblent pas jouer un rôle dans l'effet protecteur de cette substance. L'inhibition de SDH par le diazoxide n'est pas saturable, et la courbe dose-réponse ne correspond pas à celle qui est protectrice (*Schafer et al., 1971*). De plus, certains activateurs des canaux K_{ATP} (pinacidil et cromakalim) ont un effet protecteur sans action sur la SDH et le glibenclamide n'inverse pas l'inhibition de la SDH (*Portenhauser et al., 1971*).

En résumé, la majorité des études va dans le sens de l'hypothèse actuelle, cependant controversée, qui veut que la protection apportée par les activateurs de canaux K_{ATP} soit due essentiellement aux canaux mitochondriaux et peu aux canaux sarcolemmiques.

V. Caractéristiques du cœur embryonnaire de poulet

Il existe des différences et des similitudes entre le myocarde immature et le myocarde adulte, et ce chapitre a pour but d'en présenter quelques unes.

V.1. *Cardiogenèse*

Au cours du développement, la cardiogenèse est caractérisée par une activité morphogénétique intense, associée à une croissance rapide de l'embryon et de son réseau vasculaire intra et extra-embryonnaire. Durant cette période, les cardiomyocytes se divisent et se différencient, et l'activité apoptotique est normalement élevée (*Manner, 2000*).

Le cœur embryonnaire commence très tôt à battre spontanément (stade 9 somites ; *Tohse et al., 1998*) et l'impulsion électrique d'origine sino-auriculaire se propage le long du tube cardiaque. Pourtant, bien que les jonctions communicantes soient fonctionnelles dès que le cœur se contracte (*Veenstra, 1991*) et la connexine 43 (Cx 43) exprimée dès le stade 5HH (*Wiens et al., 1995*), aucun tissu cardionecteur différencié n'existe dans les premiers stades de développement. L'ECG fœtal présente cependant des composantes comparables à celui de l'adulte, à savoir une onde P, un complexe QRS et une onde T (*Paff et al., 1968; Paff et Boucek, 1975; Rosa et al., 2003*). Il n'existe pas d'innervation ortho- et parasymphatique intrinsèques dans le myocarde immature jusqu'au 16^{ème} jour du développement (*Tazawa et Hou, 1997*).

V.2. *Métabolisme énergétique*

Le métabolisme oxydatif du myocarde embryonnaire est plus faible que celui du cœur adulte, et le substrat oxydable est essentiellement le glucose et non les acides gras libres comme dans le tissu cardiaque adulte (*Lopaschuk et al., 1992*). La production aérobie de lactate est 6 fois supérieure à celle du tissu adulte (*Romano et al., 2001*) et le myocarde embryonnaire contient 10 à 20 fois plus de glycogène que le myocarde adulte (*Lopaschuk et al., 1992*). Enfin, l'étirement du tissu cardiaque est un déterminant important de la consommation d'oxygène du muscle cardiaque embryonnaire (*Romano et al., 2001*).

V.3. *Canaux et transporteurs*

Les canaux HCN (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation), responsables du courant I_f impliqué dans la fonction pacemaker, sont exprimés très tôt dans la cardiogenèse (*Stieber et al., 2003*). De plus, les composants responsables du couplage

excitation-contraction, à savoir les canaux calciques de type L, la pompe SERCA et les canaux couplés aux récepteurs à ryanodine (RyR), sont présents et fonctionnels durant le développement, mais la contribution du calcium extracellulaire est plus importante pour la contraction dans le tissu cardiaque embryonnaire que dans le cœur adulte (*Tenthorey et al., 1998*).

La résistance à l'acidose du cœur immature est plus importante que celle du cœur adulte et la régulation du pH dépend essentiellement des transporteurs de bicarbonate dans le cœur de l'embryon (*Meiltz et al., 1998*), alors que le NHE1 joue un rôle prédominant dans le myocarde adulte (*Allen et Xiao, 2003; Javadov et al., 2005*)

V.4. Réponse à l'ischémie-reperfusion

Bien que le cœur embryonnaire se développe normalement dans un environnement pauvre en oxygène, il répond rapidement à une hypoxie. En dessous de 4kPa d'oxygène (30mmHg), les premiers effets chronotropes et inotropes apparaissent, le ventricule étant plus sensible à l'anoxie que l'oreillette (*Raddatz et al., 1997*). De plus, la réoxygénation entraîne un arrêt transitoire de l'activité cardiaque suivi d'une période d'arythmies et de sidération myocardique. Tout comme chez l'adulte, le manque et la réadmission de l'oxygène se traduit par une surcharge calcique (*Tenthorey et al., 1998*), et un gonflement réversible des mitochondries et du noyau (*Sedmera et al., 2002*). Le cœur embryonnaire soumis à l'anoxie-réoxygénation produit du NO, essentiellement par la iNOS (*Terrand et al., 2003*), et des radicaux à la réoxygénation (*Raddatz et Rochat, 2002*). Alors que la présence de glucose est arythmogène et prolonge l'activité en anoxie, l'absence de substrat améliore la récupération fonctionnelle postanoxique (*Tran et al., 1996*).

V.5. Cardioprotection du cœur immature

La succession de cycles courts d'anoxie-réoxygénation (1 min d'anoxie suivie de 4 min de réoxygénation) accentue la tachycardie transitoire à l'anoxie, aggrave la contracture, et augmente l'incidence des arythmies (*Tenthorey et al., 1998*). Il semble donc que,

contrairement au cœur adulte, le cœur embryonnaire ne soit pas préconditionnable par l'ischémie. Cependant, il est possible de protéger ce cœur par d'autres moyens. Ainsi, 12 heures de pacing à fréquence physiologique permettent au cœur de mieux tolérer un épisode d'anoxie-réoxygénation (*Rosa et al., 2003*), ce qui se traduit par un remodelage myocardique structurel (*Lyon et al., 2001*) et métabolique (*Rosa et al., 2003*) similaire à celui observé chez l'adulte (*van Oosterhout et al., 2001; Vanagt et al., 2005*). L'érythropoïétine (*Lecoultre et al., 2004*), l'inhibition des canaux calciques de type L (*Tenthorey et al., 1998*) ainsi que le NO endogène et exogène (*Terrand et al., 2003*) améliorent également la récupération postanoxique de la fonction contractile du cœur.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Au cours de la gestation, toute dégradation de l'environnement intra-utérin peut être à l'origine de cardiopathies congénitales qui concernent environ 8 naissances sur 1000 (Kelly, 2002). En particulier, les perturbations cardiovasculaires pendant les périodes embryonnaires et fœtales peuvent favoriser l'apparition de cardiopathies à l'âge adulte. Cela correspond à une mémoire du cœur fœtal, ou programmation fœtale ("fetal programming")(Lau et Rogers, 2004). Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes de réponse et d'adaptation du cœur immature à une hypoxie afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques. Malgré les progrès récents de la cardiologie et la chirurgie fœtales et périnatales, les mécanismes qui sous-tendent les perturbations fonctionnelles survenant lors d'une ischémie intermittente ou prolongée, due, par exemple, à une torsion du cordon ombilical ou une anomalie placentaire sont encore mal connus. Ce travail de recherche comporte quatre volets.

I. Caractérisation de l'ECG et des arythmies dans le cœur fœtal

Le cœur embryonnaire répond très rapidement au manque d'oxygène par des perturbations électriques, contractiles et métaboliques (Tran et al., 1996; Raddatz et al., 1997; Tenthorey et al., 1998; Romano et al., 2001; Sedmera et al., 2002; Rosa et al., 2003). Malgré les nouvelles techniques permettant l'enregistrement de l'ECG du fœtus (Assaleh et Al-Nashash, 2005), les arythmies n'ont pas été systématiquement caractérisées dans le cœur embryonnaire soumis à une hypoxie suivie d'une réoxygénation.

La première phase de ce travail a donc été de caractériser précisément l'ECG embryonnaire, de décrire les arythmies déclenchées par un épisode d'anoxie suivi d'une réoxygénation strictement contrôlées et d'en établir le profil temporel. En outre, des oreillettes, des ventricules et des conotruncus ont été isolés et soumis séparément au même protocole expérimental, afin de déterminer si ces parties du cœur répondaient à une anoxie

transitoire de manière comparable et ainsi connaître la contribution respective de chacune des chambres cardiaques aux perturbations observées dans le cœur entier.

II. Effet du NO sur le couplage excitation-contraction (E-C)

Le couplage électromécanique des cardiomyocytes est très sensible au manque d'oxygène et à sa réintroduction, puisque la récupération électrique semble être plus rapide que la récupération mécanique (Louch *et al.*, 2002). D'autre part, le couplage excitation-contraction (E-C) peut être affecté par le monoxyde d'azote (NO) qui joue un rôle important dans l'homéostasie calcique. Le NO peut être bénéfique ou délétère selon sa concentration (Cotton *et al.*, 2002). Dans le myocarde embryonnaire, du NO est produit essentiellement par la iNOS en réponse à l'anoxie-réoxygénation (Terrand *et al.*, 2003). Le but de cette étude était donc d'étudier l'effet du NO endogène et exogène sur le délai électromécanique au niveau de l'oreillette et du ventricule du cœur embryonnaire soumis à une anoxie-réoxygénation.

III. Protection par l'activation des canaux K_{ATP} mitochondriaux (mito K_{ATP})

Les canaux mito K_{ATP} sont impliqués dans les voies de protection par préconditionnement ischémique ou pharmacologique. En particulier, le prétraitement par un activateur de ces canaux réduit, après une ischémie, la mort de cardiomyocytes adultes (Carroll *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Samavati *et al.*, 2002), néonataux (Ichinose *et al.*, 2003) ou embryonnaires (Yao *et al.*, 1999; Lebuffe *et al.*, 2003). Les voies de signalisation impliquées dans la protection par ouverture des canaux mito K_{ATP} , semblent impliquer les ROS, les PKC et le NO.

L'ischémie cardiaque entraîne des dommages fonctionnels qui sont aggravés par la reperfusion obligatoire. Dans les cellules embryonnaires, l'activation des canaux mito K_{ATP} diminue la mort cellulaire induite par l'hypoxie, et cet effet semble impliquer les radicaux d'oxygène et d'azote, de même que les PKC (Lebuffe *et al.*, 2003). Cependant, rien n'est connu quant à l'effet de l'ouverture des canaux mito K_{ATP} sur la fonction du cœur lors du développement. Nous avons donc voulu savoir dans quelle mesure l'activation des canaux

mitoK_{ATP} modulait la production radicalaire et la fonction cardiaque au cours d'une anoxie suivie d'une réoxygénation. Les objectifs de cette étude étaient donc 1) de mesurer la production radicalaire au cours d'un épisode d'anoxie-réoxygénation, 2) d'étudier l'effet d'un activateur des canaux mitoK_{ATP}, le diazoxide, sur la production radicalaire et la fonction cardiaque, et 3) d'étudier les voies de transduction impliquées dans la protection apportée par le diazoxide.

IV. Modulation des MAPK par l'anoxie-réoxygénation

Les MAPK semblent être impliquées dans la protection du cœur adulte reperfusé (*Michel et al., 2001*), mais aucune information n'existe concernant le profil d'activation précis des voies de signalisation impliquant les MAPK au cours de l'anoxie-réoxygénation du cœur embryonnaire. Cette dernière partie du travail avait donc pour but de déterminer les activités de ERK et de JNK pendant l'anoxie et la réoxygénation à des intervalles réguliers et de déterminer dans quelle mesure ces activités étaient modulées par l'ouverture des canaux mitoK_{ATP}.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Montage du cœur *in vitro*

Des œufs fécondés de poules Lohman Brown ont été incubés à 38°C sous 90% d'humidité pendant 96h afin d'obtenir des embryons au stade 24HH selon Hamburger et Hamilton (*Hamburger et Hamilton, 1951*). Après ouverture d'une fenêtre dans la coquille, l'embryon a été délicatement excisé. Le cœur a été explanté sous une loupe binoculaire (x12) en coupant au niveau de l'extrémité du conotruncus et de l'intersection du sinus veineux avec l'oreillette à l'aide de micro-ciseaux. Le cœur a également été découpé en oreillette, ventricule et conotruncus qui battaient spontanément à leur propre rythme.

Le cœur entier ou les parties isolées ont ensuite été placés dans une chambre en acier, spécialement conçue pour cette préparation (Figure 10 et *Raddatz et al., 1997*). Cette chambre était équipée de 2 vitres en quartz permettant l'observation du cœur et les mesures photométriques. Le cœur a été déposé sur la vitre inférieure, dans un milieu de composition définie. Une fine membrane en silicone (15µm d'épaisseur), perméable au gaz (O₂, CO₂, N₂) mais imperméable aux liquides (RTV 141, Rhône-Poulenc, Lyon, France) a été délicatement placée sur le cœur et la chambre a ensuite été fermée par la seconde vitre. Le volume du compartiment inférieur était d'environ 300µl. Le liquide a ensuite été retiré du compartiment supérieur. Après quoi le cœur a été délicatement aplati sous contrôle visuel en réduisant légèrement le volume du milieu de culture à l'aide d'une seringue télécommandée. Dans ces conditions, l'épaisseur de la préparation était environ de 300µm. Le compartiment supérieure permettait le passage de mélange gazeux de composition choisie. A ce stade de développement, le cœur n'est pas encore vascularisé, et les besoins en oxygène sont assurés par diffusion au travers du tissu. La chambre de culture a ensuite été placée dans une enceinte thermostabilisée à 37°C équipant un microscope inversé (IMT2 Olympus, Tokyo, Japon). Le milieu de culture standard était composé, en mmol/L de : 99,25 NaCl; 0,3 NaH₂PO₄; 10 NaHCO₃; 4 KCl; 0,79 MgCl₂; 0,75 CaCl₂; 8 D+glucose. Tous les

mélanges de gaz utilisés contenaient 2,31% CO₂ permettant de tamponner ce milieu à pH 7,4.

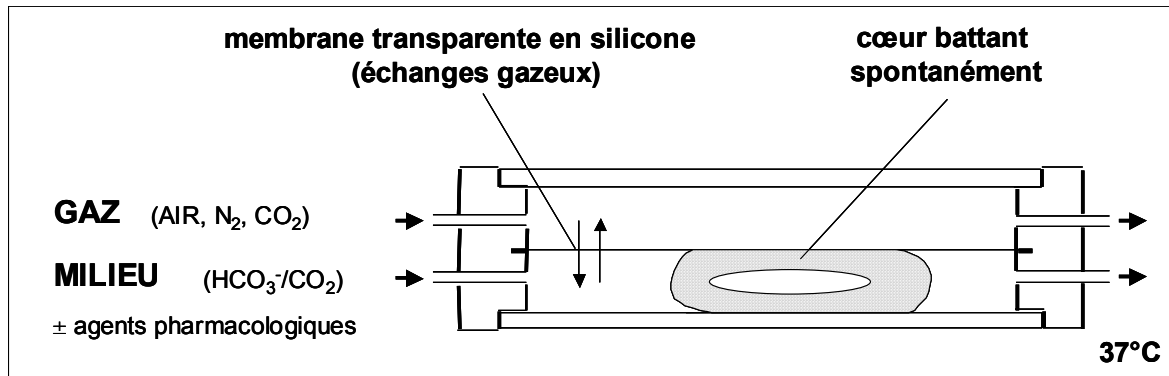


Figure 10 : Schéma de la chambre de culture utilisée pour les mesures fonctionnelles et de fluorescence. Le compartiment inférieur contenant le cœur dans du milieu de culture est séparé du compartiment supérieur par une fine membrane de silicone permettant les échanges gazeux (Modifié de Raddatz *et al.*, 1997).

II. Protocole expérimental d'anoxie-réoxygénation

Après 45 minutes de stabilisation (37°C) en normoxie (air + 2,31% CO₂), le cœur ou les différentes chambres cardiaques ont été soumis à 30 minutes d'anoxie (N₂ + 2,31% CO₂), suivies d'une heure de réoxygénation (air + 2,31% CO₂).

III. Activités électrique et contractile

Les activités électrique et contractile ont été enregistrées simultanément tout au long des expériences.

III.1. Enregistrement de l'activité électrique (ECG et électrogramme)

La fonction électrique du cœur ou des différentes chambres cardiaques a été enregistrée à l'aide de deux électrodes (Ag/AgCl) de diamètre 0,625 mm insérées dans la vitre inférieure de la chambre et éloignées l'une de l'autre de 1,2 mm (entraxe). Le cœur a été placé à proximité des électrodes (une proche de l'oreillette, l'autre proche du ventricule ;

Figure 11). Les électrodes ont été connectées à un amplificateur (gain=2000), résultant en un signal de 1 à 5V pic à pic. Le signal a ensuite été digitalisé et enregistré par un ordinateur à une fréquence de 250 Hz (Apple Macintosh) ou à haute fréquence (2000 Hz) par le logiciel IOX (EMKA, France).

III.2. Enregistrement de l'activité contractile

La contractilité a été enregistrée grâce à deux phototransistors, placés sur l'image projetée du cœur au niveau de la région sino-auriculaire et au niveau de l'apex du ventricule (Figure 11B). Les phototransistors ont permis d'enregistrer le mouvement du bord de la paroi myocardique au cours du cycle cardiaque. Le signal a été amplifié par un amplificateur logarithmique et transmis au système d'acquisition de l'ordinateur. La distance réelle entre les deux régions étudiées était de $2,3 \pm 0,2$ mm (n=56).

modèle expérimental

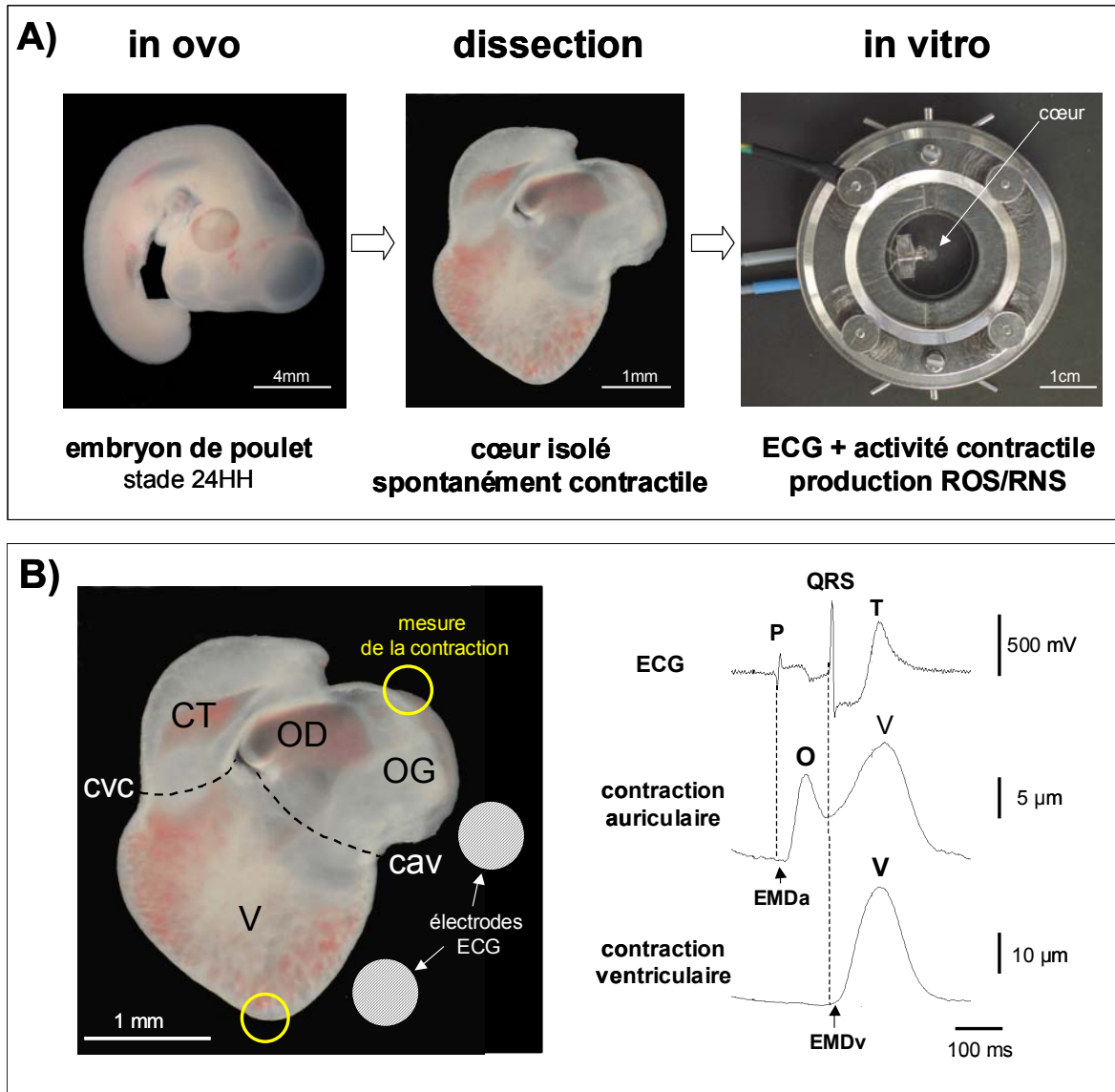


Figure 11 : A) De gauche à droite, embryon de poulet au stade 24HH, cœur isolé et chambre de culture. B) Cœur embryonnaire au stade 24HH monté *in vitro* et enregistrement représentatif de l'activité électrique et contractile. O : oreillette ; OD et OG : oreillette droite et gauche ; V : ventricule ; CT : conotruncus ; cav : canal auriculo-ventriculaire ; cvc : canal ventriculo-conotruncal ; P, QRS et T : ondes P, complexe QRS et onde T de l'ECG ; EMDa et EMDv : délai électromécanique auriculaire et ventriculaire, respectivement. Les pointillés indiquent où les cœurs ont été découpés.

III.3. Mesure des paramètres fonctionnels

III.3.a. Paramètres électriques

L'électrocardiogramme présente une onde P, un complexe QRS et une onde T reconnaissables permettant d'évaluer la fréquence cardiaque (bpm), le délai auriculo-ventriculaire (intervalle PR, ms) et la durée de la dépolarisation ventriculaire (durée du QT, ms). En outre, les différents types d'arythmies et de blocs de conduction auriculo-ventriculaires, ainsi que leur durée ont été analysés. L'analyse de l'ECG a été réalisée manuellement et de manière semi-automatique à l'aide d'un logiciel de reconnaissance de forme (ECG-Auto, EMKA, France).

Les arythmies ont été caractérisées essentiellement selon les définitions utilisées en médecine humaine. *Bradycardie auriculaire*: rythme auriculaire soutenu de fréquence inférieure à 130 bpm; *arrêt auriculaire*: pause auriculaire soudaine de durée variable; *arythmie auriculaire*: systole auriculaire prématurée; *échappement ventriculaire*: plus de 3 complexes avec une dissociation auriculo-ventriculaire (AV); *bloc de 3^{ème} degré*: absence complète et soutenue de conduction AV; *bloc AV n/1*: bloc de second degré soutenu avec un rapport n/1 constant entre l'oreillette et le ventricule durant un rythme auriculaire régulier et non lié à une tachycardie auriculaire; *bloc de second degré*: phénomène de Wenckebach durant un rythme auriculaire régulier non lié à une tachycardie auriculaire avec une prolongation progressive du PR précédant un bloc AV.

Le rapport T/QRS a été calculé en divisant l'amplitude de l'onde T, mesurée de la ligne isoélectrique au sommet de l'onde, par l'amplitude du complexe QRS mesurée du pic de l'onde R au pic de l'onde S.

Une représentation de l'évolution de l'ECG au cours de l'anoxie et de la réoxygénation a été réalisée en superposant les complexes moyens de l'ECG calculés sur 30 secondes, tout au long du protocole, et ce toutes les minutes.

III.3.b. Paramètres contractiles

L'enregistrement simultané des contractions auriculaire et ventriculaire a permis de mesurer les amplitudes des contractions respectives ("shortening", S), les vitesses de contraction et de relaxation, mesurées respectivement au pic positif et négatif de la dérivée du signal ($\pm dS/dt$, mm/s). Les amplitudes réelles de contraction (S , μm) ont été déterminées sur la base d'enregistrements vidéo réalisés après stabilisation normoxique et à la fin de l'expérience.

La vitesse de propagation auriculo-ventriculaire mécanique moyenne (propagation AV, mm/s) a été calculée en divisant la distance entre l'oreillette et le ventricule par le délai entre la contraction auriculaire et la contraction ventriculaire.

III.3.c. Couplage excitation-contraction

Le délai entre l'activation électrique et l'activation mécanique reflète le couplage excitation-contraction (E-C). Le délai électromécanique de l'oreillette (EMDa) a été mesuré entre l'activation initiale de l'onde P et l'activation mécanique initiale de l'oreillette. De même, le délai électromécanique ventriculaire (EMDv) a été mesuré entre le début du complexe QRS et l'initiation de la contraction ventriculaire.

Tous les paramètres ont été mesurés après 45 minutes de stabilisation normoxique à 37°C et au cours du protocole expérimental d'anoxie-réoxygénation.

IV. Production radicalaire myocardique

Principe : La production de radicaux libres a été mesurée en utilisant la sonde intracellulaire non fluorescente 2',7'-dichlorofluoresceine (DCFH). La forme diacétate du DCFH (DCFH-DA) peut traverser les membranes biologiques. Ce produit a été dissout dans du méthanol à une concentration de 40mM (aliquots stock) et gardé à -20°C. La solution stock a été dissoute juste avant l'expérience dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10 μM . A l'intérieur de la cellule, les estérases clivent les groupements acétate du DCFH-DA, ce qui piège le DCFH dans la cellule (*Murrant et Reid, 2001*). Le DCFH est connu pour être oxydé préférentiellement par le peroxyde d'hydrogène

H₂O₂ ou le radical hydroxyle HO• mais peu par l'anion superoxyde O₂•⁻ (Halliwell et Gutteridge, 1998a) générant la sonde fluorescente 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF). La sonde a été excitée à 490 nm, et la fluorescence émise a été mesurée à 530 ± 3 nm.

Les cœurs isolés ont été chargés avec le DCFH-DA durant environ 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cœurs ont ensuite été montés dans la chambre de culture et le milieu renouvelé avec une solution fraîche de DCFH-DA. La chambre a ensuite été placée sur la platine thermostabilisée (37°C) d'un microscope à épifluorescence (Leitz, Allemagne) 15 minutes avant la première mesure. La fluorescence, exprimée en unités arbitraires (u.a.), a été mesurée sur une surface limitée du ventricule (300µm de diamètre) toutes les 30 secondes durant le protocole d'anoxie-réoxygénation (Figure 12).

Afin de minimiser la photo-dégradation ("photobleaching") de la sonde fluorescente, la durée d'illumination a été réduite à 6 ms. La pente du signal de fluorescence en fonction du temps représente la production de radicaux d'oxygène et a été exprimée en unité arbitraire par seconde (u.a/s).

Pour tenir compte des variations interindividuelles de taille et les légères différences de stade de développement des cœurs, l'aire ventriculaire en fin de diastole (mm²) a été calculée par gravimétrie à partir d'une image vidéo du cœur enregistrée à la fin de l'expérience. Pour ce faire, le contour du cœur ainsi qu'un carré de calibration représentant 0,25 mm² réels ont été tracés sur un film transparent. Ce film a ensuite été découpé précisément selon le contour du cœur et au niveau du canal auriculo-ventriculaire et du canal ventriculo-conotroncal, permettant ainsi de calculer les aires des oreillettes, ventricule et conotronicus. Le cœur étant légèrement aplati par la membrane de silicone, la surface totale réelle de la paroi ventriculaire a été estimée en doublant l'aire ainsi obtenue. La densité de protéine de la paroi ventriculaire a été calculée en divisant le contenu protéique du ventricule par l'aire de celui-ci, et exprimée en µg prot./mm².

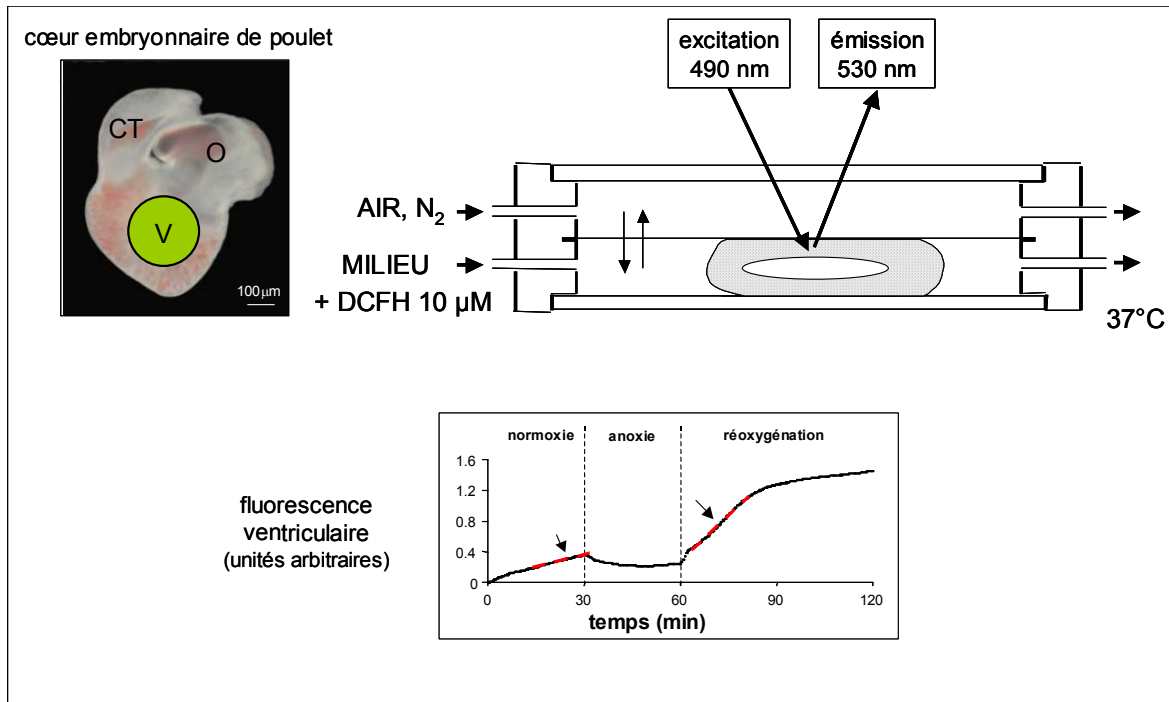


Figure 12 : Mesure localisée de la production radicalaire par la technique du DCFH au cours de l'anoxie-réoxygénation. La zone ventriculaire sur laquelle la fluorescence a été mesurée est symbolisée par le disque vert. La production de radicaux a été évaluée en mesurant la pente préanoxique et à la réoxygénation (flèches) ; O : oreillette ; V : ventricule ; CT : conotruncus.

La production radicalaire mesurée par la technique du DCFH était fortement dépendante de la présence d'oxygène. En effet, alors que la pente du signal de fluorescence, traduisant une production de ROS, était forte en présence de 98% O₂, elle était quasiment nulle en l'absence totale d'oxygène (Figure 13).

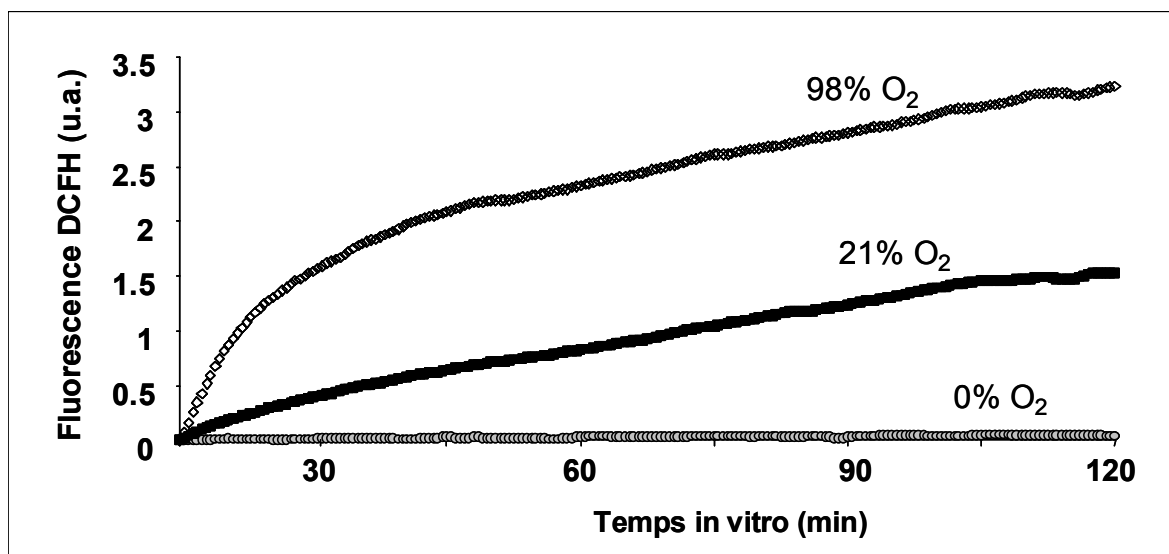


Figure 13 : La fluorescence du DCFH est dépendante de la présence d'oxygène.

V. Activité kinase (ERK et JNK)

L'activité des kinases ERK et JNK a été déterminée par la technique de Larsen et coll. (Larsen et al., 1998) légèrement modifiée.

V.1. *Préparation des échantillons*

Six cœurs au stade 24HH ont été montés ensemble dans la chambre de culture comme décrit ci-dessus et soumis à 45 minutes de stabilisation en normoxie (21% O₂ + 2,31% CO₂), suivis de 10, 20 ou 30 minutes d'anoxie (N₂ + 2,31 % CO₂) et de 10, 20, 30, 40, 50, ou 60 minutes de réoxygénation (21% O₂ + 2,31% CO₂). Les cœurs ont été prélevés aux temps indiqués puis découpés délicatement à froid (4°C) en oreillette, ventricule et conotruncus (cf.

VII. Dosage des protéines et du glycogène). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'aux dosages. Seuls les ventricules ont été utilisés dans les dosages de l'activité des kinases.

Les ventricules ont été lysés sur la glace par sonication dans 100µl de tampon de lyse (20mM tris-acétate pH7, 0,27M sucrose, 1mM EGTA, 1mM EDTA ; 50mM NaF, 1% Triton® X-100, 10mM β-glycérophosphate, 10mM 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT), 10mM 4-nitrophenyl phosphate (PNPP), anti-protéases) afin d'obtenir une concentration d'environ 1µg prot./µl. Les débris insolubles dans le détergent ont été éliminés par centrifugation à froid pendant 5 minutes à 10 000 rpm. Le contenu en protéines du surnageant a été dosé (cf.

IV. Dosage des protéines et du glycogène) puis utilisé pour le dosage de l'activité kinase ou conservées à -80°C.

V.2. *Expression et purification des protéines de fusion Glutathion-S-Transférase (GST)*

Les protéines de fusion représentent les substrats des kinases, qui, après purification, sont liées à des billes d'agarose. L'expression des protéines de fusion a été réalisée dans des bactéries E. Coli transfectées par un plasmide pGEX-4T1 contenant un insert Elk1 humain (acides aminés 307 à 429 du vecteur pFA2-Elk1 (Stratagene)), ou un insert cJun humain

(acides aminés 1 à 219 de pFA2-cJun). Après une nuit de croissance, l'expression de la protéine de fusion GST-Elk ou GST-c-Jun a été induite par l'ajout de 100nM d'Isopropyl-1-β-D-thio-1-galactopyranoside (IPTG). Les cellules ont été lysées à froid par sonication dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) contenant 1% Triton® X-100. Après centrifugation, les protéines ont été incubées 30 minutes avec 1ml de billes glutathion-agarose à 4°C sous agitation douce. Ceci permet au substrat de se lier aux billes. Les billes-GST ont été lavées trois fois avec du PBS à 4°C puis aliquotées et conservées à -80°C.

V.3. Dosage de l'activité des kinases ERK et JNK

De 20 à 30µg de protéines ventriculaires ont été incubés durant 3 heures à 4°C avec 8 ± 1 µg de billes glutathion-agarose couplées à GST-Elk ou GST-c-Jun. Les billes ont ensuite été lavées 3 fois dans du tampon de lavage (même composition que le tampon de lyse mais avec 0,1% Triton® X-100), puis 2 fois dans du tampon de réaction (20mM Hepes pH7,5, 10mM MgCl₂, 20mM β-glycérophosphate, 10mM DTT, 10mM PNPP, anti-protéases). La réaction kinase a été réalisée en ajoutant 5µCi de ³³P-ATP aux billes dans un volume total de 20µl de tampon, durant 30 minutes à 30°C. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 10µl de tampon de charge SDS puis ébullition durant 5 minutes à 95°C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) en utilisant un gel de concentration à 4% et un gel de séparation à 10% d'acrylamide. Les gels ont ensuite été colorés au bleu de Coomassie, séchés et les protéines phosphorylées visualisées par autoradiographie et quantifiées par analyse sur PhosphoImager (Quantity-one 1.4.0, Biorad). Les valeurs d'activité obtenues ont ensuite été rapportées à celles du contrôle préanoxique.

VI. Dosages des protéines et du glycogène

A la fin de chaque expérience, les cœurs ont été systématiquement découpés au niveau du canal auriculo-ventriculaire et de la jonction ventriculo-conotroncale, en oreillette, ventricule et conotruncus et conservés à -20°C pour dosage ultérieurs.

Après décongélation, les échantillons ont été homogénéisés par sonication (3 x 3 s sur glace). Le contenu en protéines a été dosé selon la méthode de Lowry (*Lowry et al., 1951*) en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme calibration.

Le glycogène a été dosé sur les mêmes échantillons par spectrofluorométrie d'après la technique de Nahorski et Rogers (*Nahorski et Rogers, 1972*), et exprimé en équivalent glucose (GU) par μg de protéine (GU/ μg prot.). La méthode consiste à hydrolyser le glycogène en glucose par l'amyloglucosidase et à phosphoryler le glucose ainsi obtenu en glucose 6-phosphate par l'hexokinase puis en phosphoglucono δ -lactone par la glucose 6-phosphate déshydrogénase en présence de NAD(P)⁺. Cette dernière réaction réduit le NAD(P)⁺ en NAD(P)H, qui est quantifié par fluorescence (excitation à 340 nm et émission à 450 nm).

VII. Statistiques

Les résultats ont généralement été exprimés en moyenne \pm DS (déviation standard) ou ESM (erreur standard à la moyenne). Les différences entre groupes ont été testées par une analyse de variance (ANOVA) ou un test t de Student. Les cinétiques de récupération post-anoxiques des différents groupes ont été comparées par une ANOVA en mesures répétées ("repeated-measures ANOVA"). Enfin, un test t de Student apparié a été utilisé pour comparer les différences entre les valeurs mesurées lors de l'anoxie-réoxygénation et la valeur préanoxique. Le seuil de significativité statistique est $p < 0,05$.

RESULTATS

I. Caractérisation électrocardiographique du cœur embryonnaire

Une partie de ce travail a donné lieu à trois résumés : (Raddatz et al., 2005; Sarre et al., 2005c; Sarre et al., 2005d).

Article en préparation.

I.1. Stabilité des paramètres fonctionnels in vitro

Les paramètres mesurés, après la période de stabilisation était stables durant au moins 3 heures (Tableau 1 et Figure 14). Durant la période de stabilisation, 70% des cœurs présentaient des arythmies auriculaires transitoires réparties de la 10^{ème} à la 30^{ème} min du réchauffement. Ce phénomène se traduit par une grande variabilité de la fréquence cardiaque durant cette période (Figure 14).

PACEMAKER:		
rythme sinusal		165 ± 9 bpm
DUREE DU POTENTIEL D'ACTION:		
durée du QT (cœur entier)		161 ± 14 ms
oreillette isolée		78 ± 6 ms
ventricule isolé (QT)		111 ± 7 ms
CONDUCTION AURICULO-VENTRICULAIRE:		
intervalle PR		130 ± 17 ms
délai mécanique AV		150 ± 17 ms
vitesse de propagation AV		15,7 ± 1 mm/s
COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION:		
délai électro-mécanique auriculaire (EMDa)		21 ± 2 ms
délai électro-mécanique ventriculaire (EMDv)		14 ± 2 ms
CONTRACTILITÉ:		
contraction ventriculaire (apex)		19 ± 7 µm
vitesse de contraction (apex)		4,2 ± 1,4 mm/s
MÉTABOLISME:		
glycogène / protéine:	- oreillette	1,63 ± 0,72
(nmol GU / µg)	- ventricule	0,90 ± 0,28
	- conotruncus	0,65 ± 0,25

Tableau 1: Paramètres fonctionnels mesurés *in vitro* en normoxie après 45 minutes de stabilisation ; bpm : battements par minute ; GU : équivalent glucose (stade 24HH, moyenne ± DS, n = 8-10).

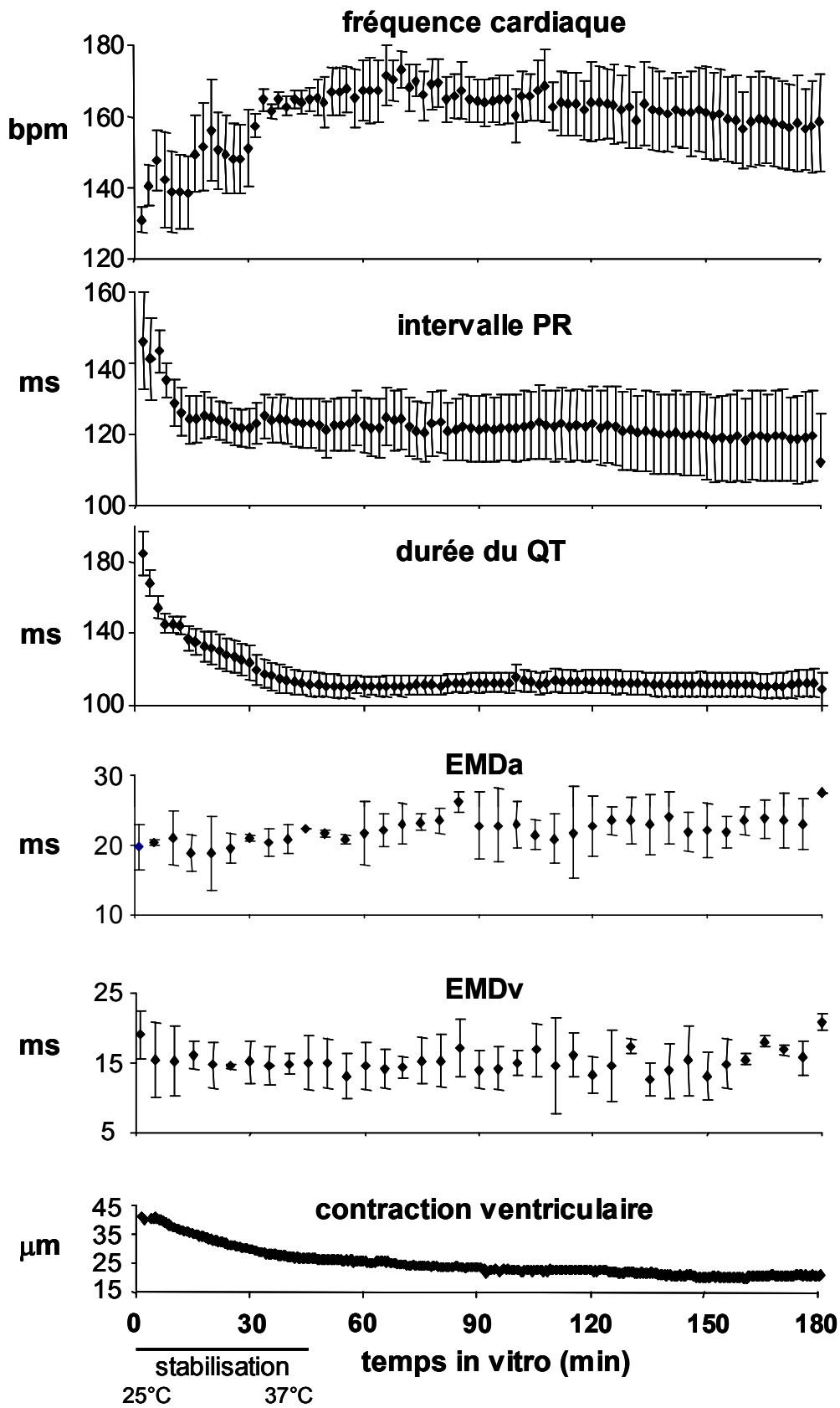


Figure 14 : Après une période de stabilisation in vitro, les paramètres fonctionnels mesurés restaient stables durant au moins 3 heures à 37°C en normoxie. EMDa, EMDv : délais électromécaniques auriculaire et ventriculaire, respectivement (moyenne \pm DS, n = 5).

I.2. Effets de l'anoxie-réoxygénation

L'anoxie entraînait une tachycardie transitoire suivie d'une bradycardie, allant jusqu'à l'arrêt complet de l'activité cardiaque (Figure 15). Une activité résiduelle sous forme de bouffées persistait jusqu'à la fin de l'anoxie. Cependant, l'arrêt ventriculaire était plus précoce que celui de l'oreillette (8 ± 7 et 15 ± 10 min, respectivement ; $n=4$). La propagation auriculo-ventriculaire (AV) était progressivement ralentie durant l'anoxie, comme l'atteste l'allongement de l'intervalle PR. La durée du QT, après un raccourcissement transitoire, était faiblement rallongée durant l'anoxie. Le délai électromécanique auriculaire était peu affecté, alors que le délai électromécanique ventriculaire augmentait progressivement et sa durée était doublée en fin d'anoxie (Figure 15).

La réoxygénation entraînait une cardioplégie (43 ± 28 s, variant entre 10 et 90 s, $n=6$). Ensuite, la fréquence auriculaire augmentait progressivement durant les 10 à 12 premières minutes atteignant un maximum (légère tachycardie) avant de retrouver sa valeur préanoxique. L'intervalle PR, qui représente la conduction auriculo-ventriculaire, recouvrait progressivement sa valeur préanoxique après environ 30 minutes. La durée du QT était augmentée de 30 ± 18 % dès la réintroduction de l'oxygène et rejoignait peu à peu sa valeur préanoxique. Le délai électromécanique ventriculaire (EMD_v) récupérait lentement durant la réoxygénation. L'EMD_a étant peu affecté par l'anoxie, retrouvait très rapidement sa valeur initiale.

La variation du rapport des amplitudes des ondes T et du complexe QRS (T/QRS) est considérée comme un témoin de la souffrance fœtale (*Welin et al., 2005*). Dans nos conditions, ce rapport variait de façon importante au cours de l'anoxie et de la réoxygénation (Figure 15).

Les modifications de morphologie de l'ECG au cours de l'anoxie et de la réoxygénation sont illustrées dans la Figure 16, composée de la superposition de tracés moyens d'ECG (*Cf. MATÉRIEL ET MÉTHODES III.3.*).

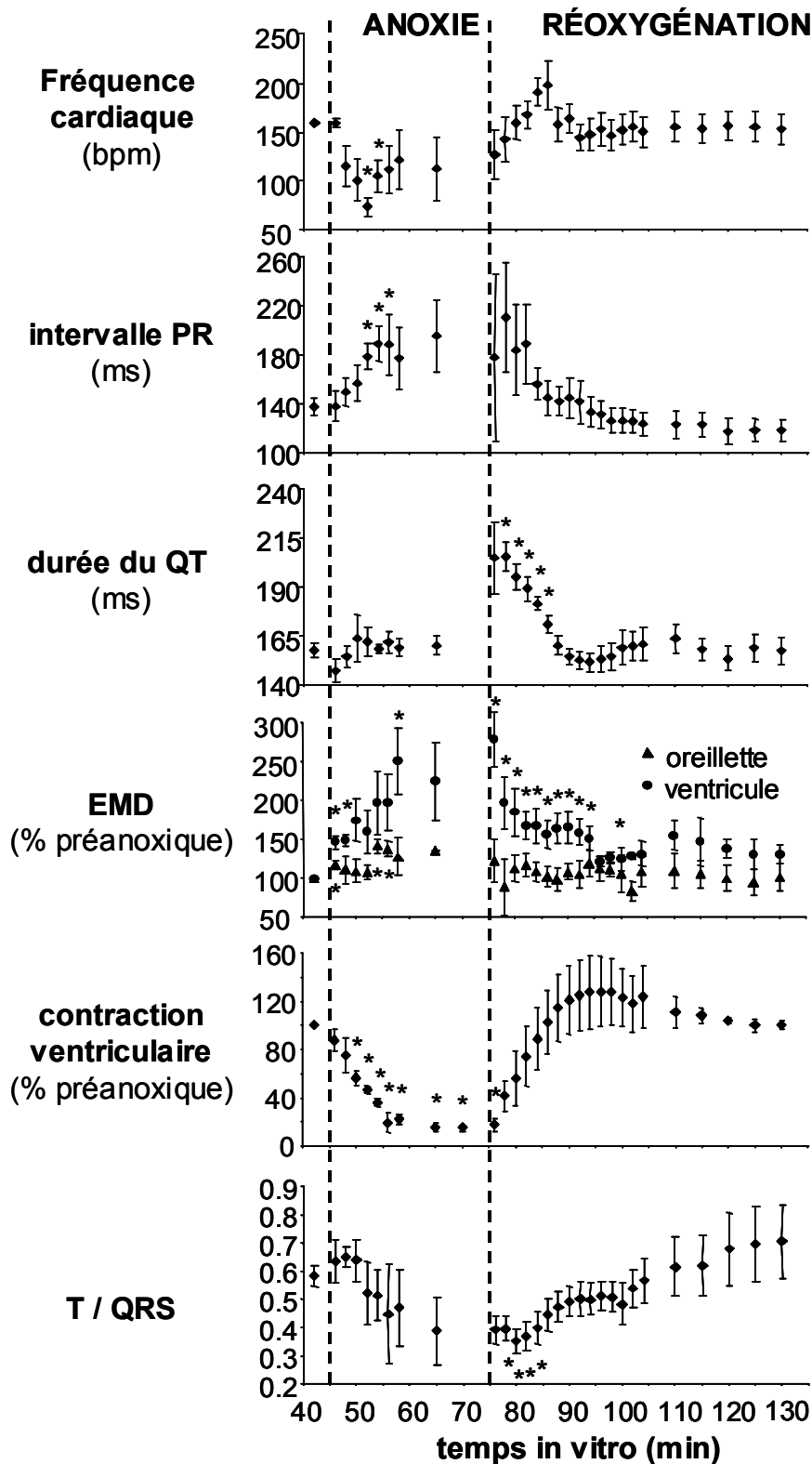


Figure 15 : Evolution de la fréquence cardiaque, de l'intervalle PR, de la durée du QT, de l'EMD, de l'amplitude de contraction ventriculaire et du rapport T/QRS au cours de l'anoxie-réoxygénation. Afin de faciliter la compréhension, les points ont été représentés toutes les 2 minutes (moyenne \pm ESM, n=4). * : p<0.05 vs préanoxie (test t de Student apparié).

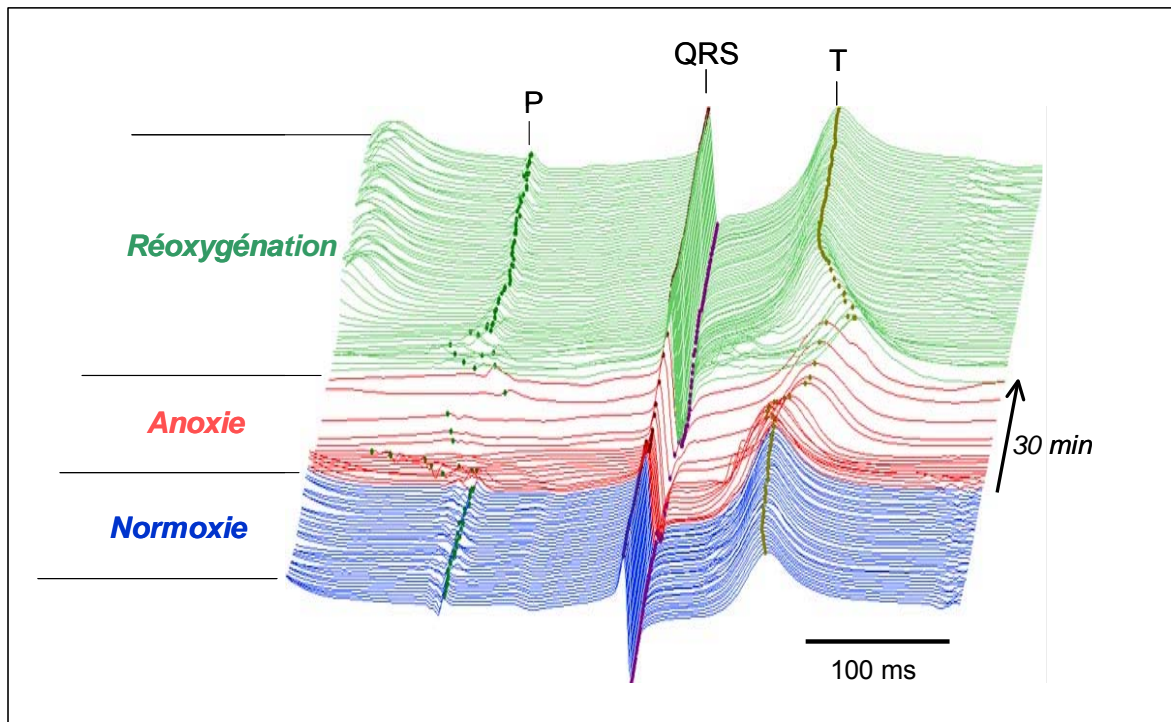


Figure 16 : Représentation des modifications de la morphologie de l’ECG durant l’anoxie et la réoxygénation. Chaque tracé est le tracé moyen obtenu sur 30s et représenté toutes les minutes. Les points indiquent les sommets des ondes P, R, S et T.

1.3. Type et incidence des arythmies déclenchées par l’anoxie-réoxygénation

Au cours de l’anoxie, les bouffées d’activité séparées par des périodes de quiescence électromécanique peuvent prendre deux formes :

- reprise de l’activité auriculaire couplée à l’activité ventriculaire (“burst” ; Figure 17 A)
- reprise de l’activité ventriculaire après un épisode de bloc AV de 3^{ème} degré (bloc AV intermittent de 3^{ème} degré ; Figure 17 B).

Ces types d’arythmies sont également observables durant la réoxygénation.

Des variations de l’intervalle RR, et une contracture ventriculaire sont observables durant ces bouffées d’activité (Figure 17, A et B).

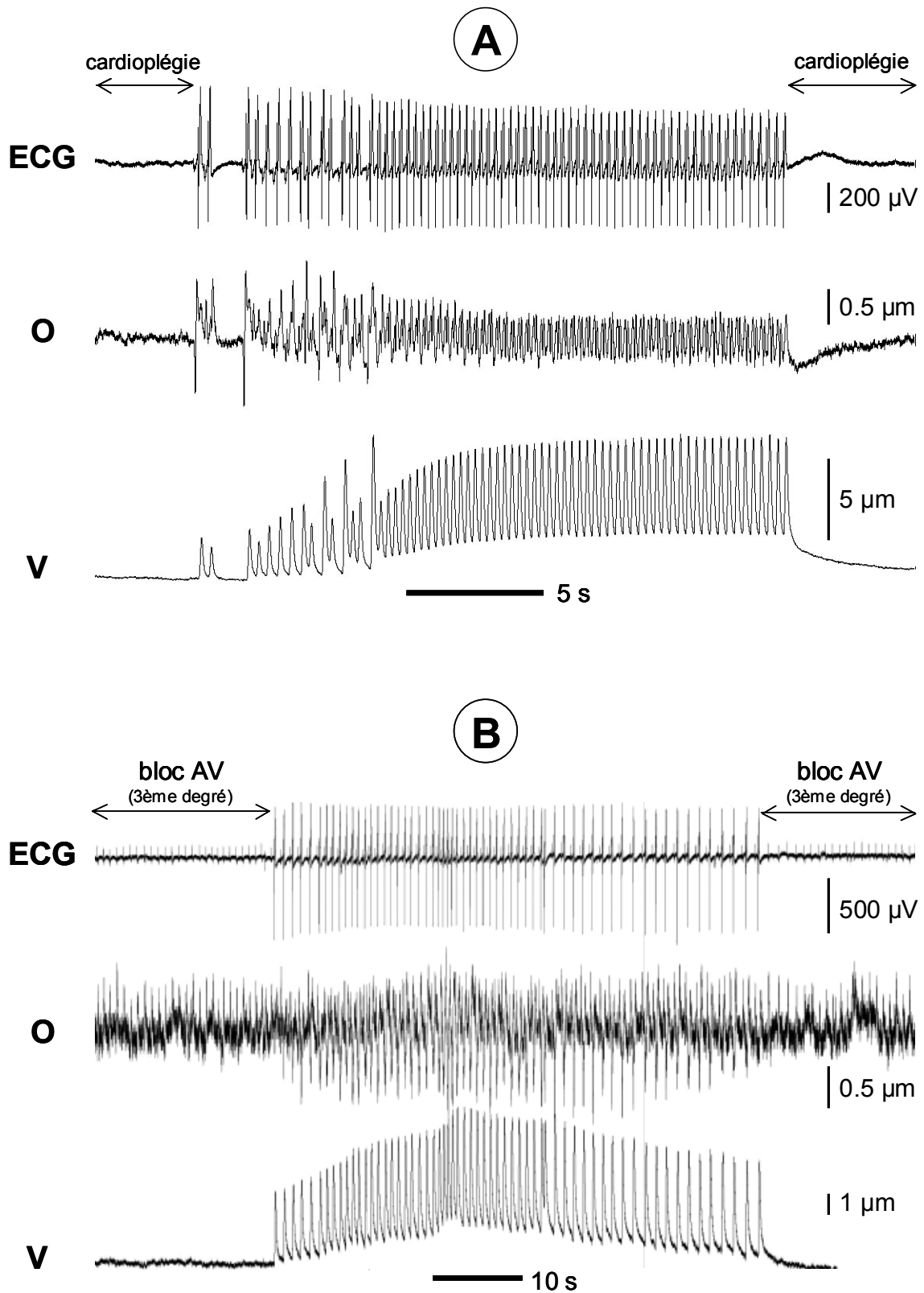


Figure 17 : Arrêt sinusal avec reprises intermittentes (A) et bloc AV intermittent de 3^{ème} degré associé à une activité ventriculaire sous forme de bouffée (B), observables durant l’anoxie et la réoxygénation. Une variation de l’intervalle RR et une contracture ventriculaire étaient caractéristiques de ces bouffées d’activité. O: oreillette ; V: ventricule.

L'anoxie et la réoxygénation étaient accompagnées de troubles du rythme auriculaire (arythmies auriculaires) et de troubles de conduction auriculo-ventriculaire, se traduisant par des blocs de conduction du deuxième degré (bloc 2/1 ou 3/1), représentés sur la figure 18.

La réoxygénation entraînait les mêmes types d'arythmies que l'anoxie mais également des blocs de conduction 3/2 et le phénomène de Wenckebach caractérisé par un allongement progressif de l'intervalle PR aboutissant à un bloc de conduction. Ces arythmies précédaient systématiquement la récupération cardiaque. En effet, les Wenckebach étaient les dernières arythmies observables à la réoxygénation, et leur apparition était, dans notre modèle, le signe de l'amélioration de la conduction. Enfin, des épisodes d'échappement ventriculaire étaient observés dans moins de 10% des cœurs (Figure 18). Aucune dissociation électromécanique, fibrillation ou extrasystole ventriculaire n'ont été observées durant l'anoxie ou la réoxygénation.

Le profil temporel de survenu des différentes arythmies est représenté sur la figure 19.

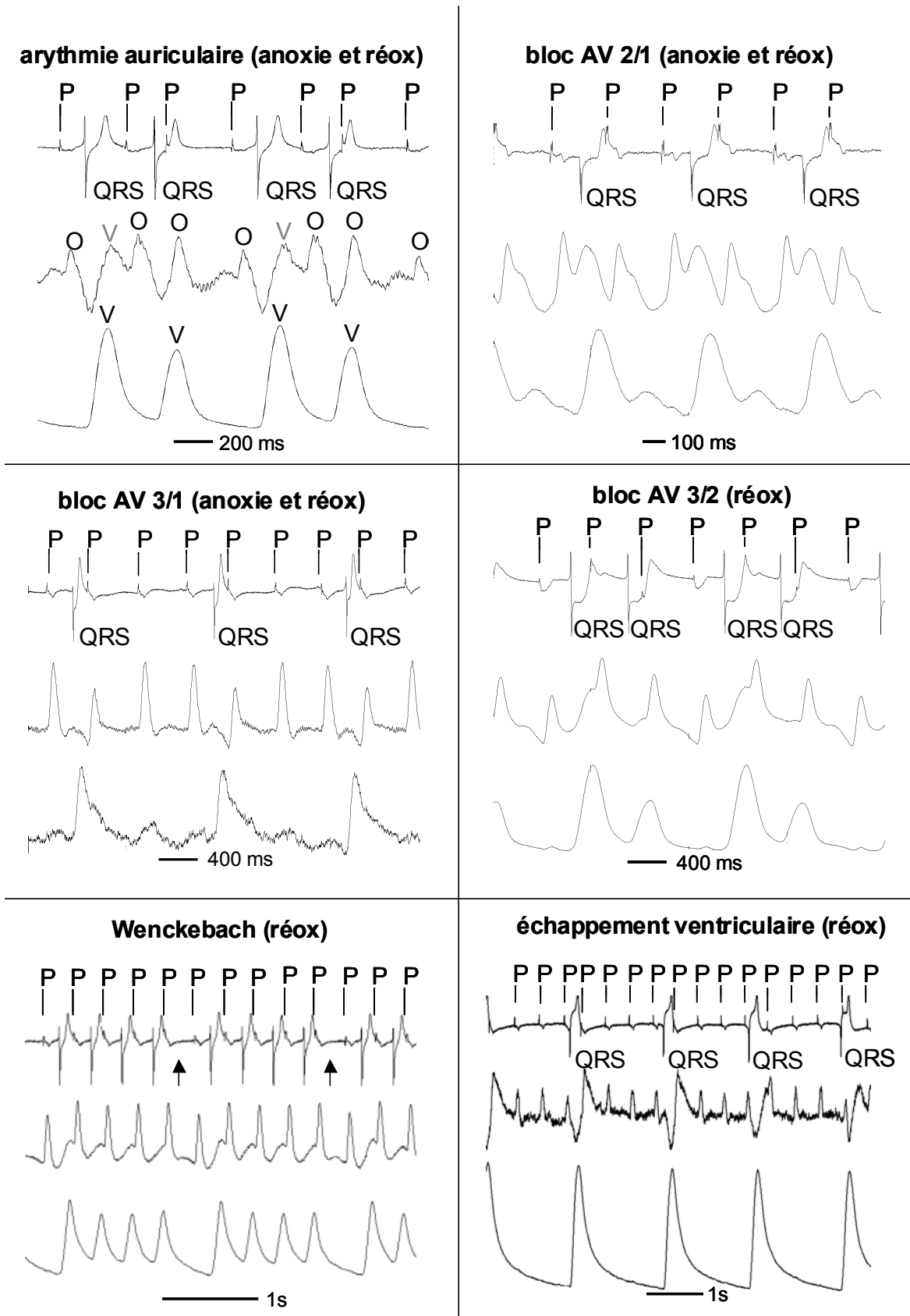


Figure 18: Principaux types d'arythmies observées durant l'anoxie et la réoxygénation (réox). L'ECG (tracé supérieur) et les contractions auriculaires (tracé du milieu) et ventriculaires (tracé du bas) sont représentés. O: oreillette; V: ventricule.

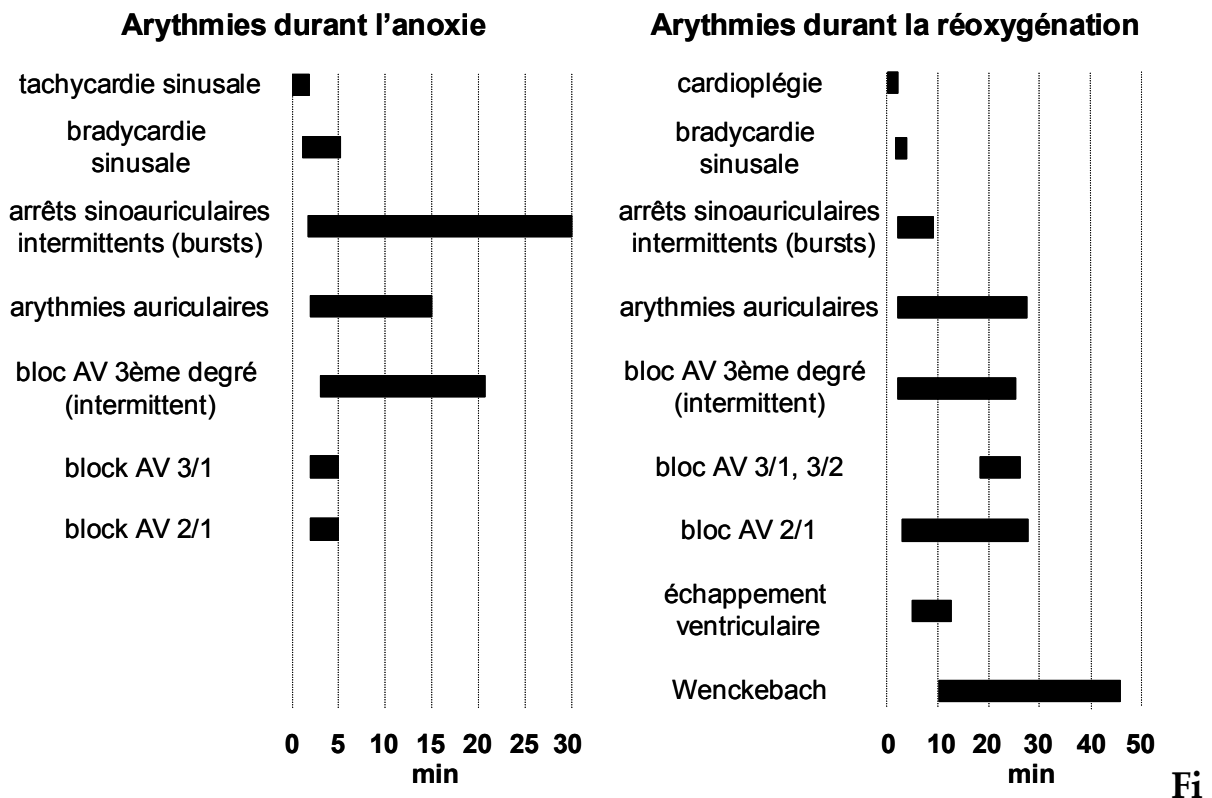


Figure 19 : Types d'arythmies observées au cours de l'anoxie et de la réoxygénation.

I.4. Réponse de l'oreillette, du ventricule et du conotruncus isolés à l'anoxie-réoxygénation

Les différentes parties du cœur, une fois isolées et stabilisées à 37°C avaient chacune une fréquence propre, à savoir 163 ± 17 (n=3), 83 ± 28 (n=3) et 26 ± 12 bpm (n=3) pour l'oreillette, le ventricule et le conotruncus, respectivement.

Effet de l'anoxie: L'oreillette isolée répondait à l'anoxie par une tachycardie transitoire, similaire à celle observée dans le cœur entier, puis une bradycardie suivie d'une activité sous forme de bouffées (Figure 20). La durée de la dépolarisation auriculaire augmentait légèrement durant cette période. Le ventricule, au contraire, s'arrêtait de battre après environ 5 minutes. Cependant, un des ventricules sur les trois étudiés présentait une activité soutenue durant 15 minutes. La durée du QT diminuait transitoirement puis augmentait progressivement. Après l'arrêt des contractions, aucune activité n'était enregistrée jusqu'à la réoxygénation. Le conotruncus s'arrêtait rapidement durant l'anoxie en moins de 5 minutes.

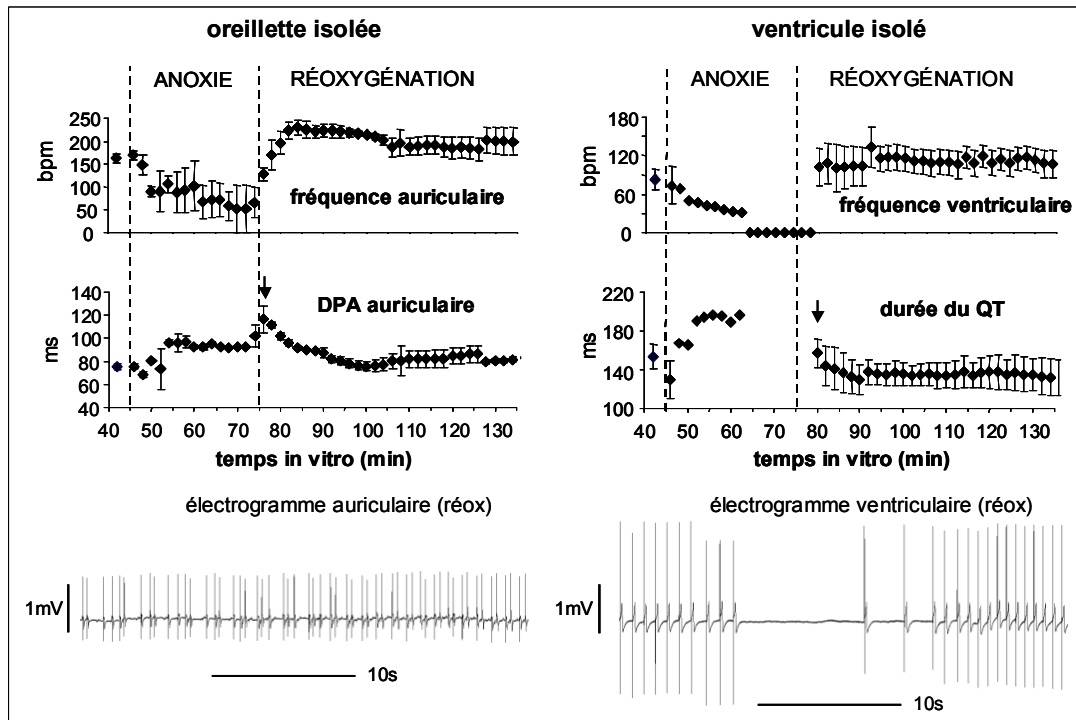


Figure 20 : Les réponses de l'oreillette et du ventricule à l'anoxie et à la réoxygénation étaient différentes. Alors que l'oreillette maintenait une activité sous forme de bouffées en absence d'oxygène, le ventricule cessait rapidement toute activité (à noter qu'un ventricule sur trois montrait une activité durant 15 minutes d'anoxie). Les arythmies observées à la réoxygénation (flèches) sont illustrées par les électrogrammes auriculaire et ventriculaire. DPA : durée du potentiel d'action de l'oreillette ; réox : réoxygénation (moyenne \pm DS ; n=3).

Effet de la réoxygénation : L'oreillette retrouvait une activité contractile normale dès la réadmission de l'oxygène, alors que le ventricule ne reprenait son activité spontanée qu'après au moins 2 minutes. Il faut noter que le ventricule qui s'était arrêté après 15 minutes d'anoxie ne présentait aucune activité avant 15 minutes de réoxygénation. La durée de la dépolarisation auriculaire augmentait brutalement de 55 ± 30 % avant de récupérer progressivement sa valeur préanoxique. Par contre, la durée du QT semblait être moins affectée par la réoxygénation lorsque le ventricule était isolé. En effet, une faible augmentation de sa durée était observée à la réoxygénation, et la récupération était rapide (Figures 20 et 21). Le ventricule isolé présentait peu d'arythmies, alors que de nombreuses arythmies auriculaires étaient observées. Le conotruncus retrouvait progressivement son activité normale durant la réoxygénation. Les trois parties du coeur présentaient une sidération à la réoxygénation (Figure 21).

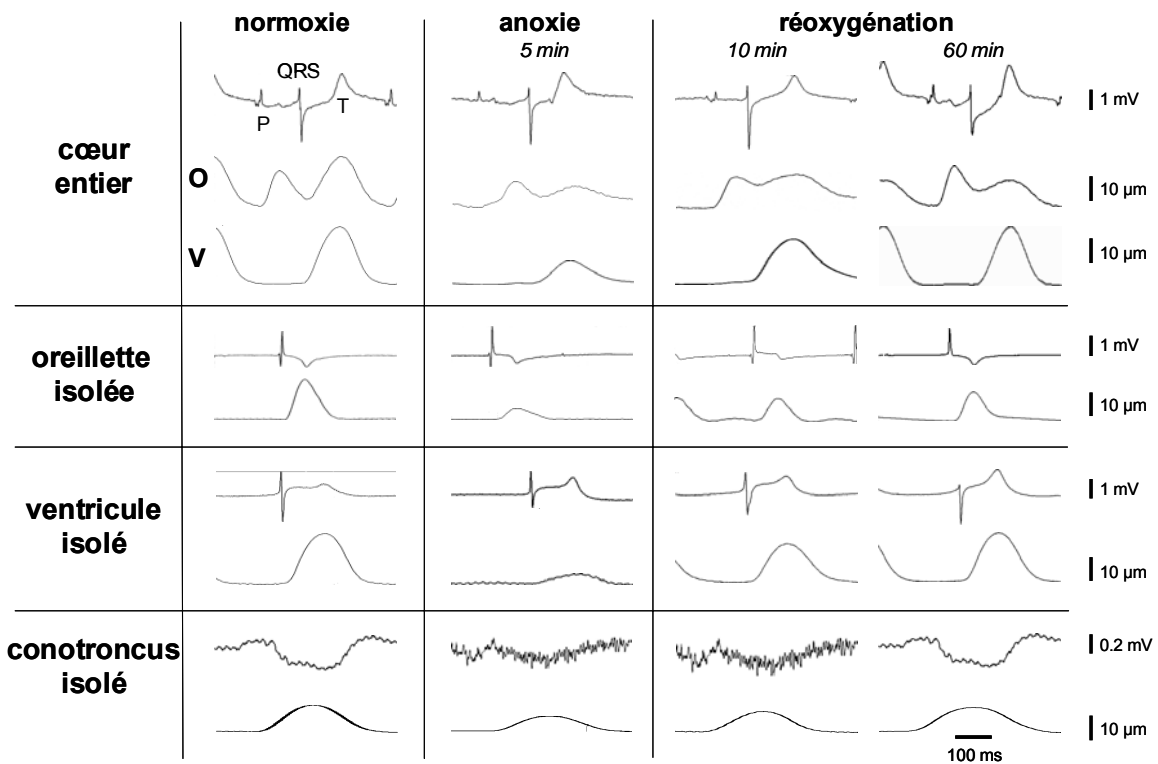


Figure 21 : Enregistrements caractéristiques de l'activité électrique (trace du haut) et contractile (traces du bas) du cœur entier, de l'oreillette, du ventricule et du conotruncus isolés en normoxie, après 5 minutes d'anoxie et 10 et 60 minutes de réoxygénation. O : oreillette ; V : ventricule.

1.5. Discussion

A notre connaissance, c'est la première fois que le profil des arythmies déclenchées par l'anoxie et la réoxygénation est précisément établi dans le cœur embryonnaire. De plus, le fait que l'activité spontanée des chambres cardiaques isolées puisse être maintenue *in vitro* dans des conditions strictement contrôlées, nous a permis de caractériser séparément les perturbations électriques et mécaniques de chaque région soumise au même protocole que le cœur entier.

Dans le passé, l'activité électrique du tissu cardiaque de l'embryon de poulet à différents stades de développement a été étudiée *in ovo* (Kolesari et al., 1988; Sugiyama et al., 1996), sur des embryons entiers (Hoff et al., 1939), sur des cœurs isolés (Paff et al., 1968), sur des chambres cardiaques isolées (Boucek et al., 1959; Paff et Boucek, 1962) ou sur des cardiomyocytes en culture (Veenstra, 1991).

D'après Paff et Boucek, la contribution du conotruncus à l'ECG consiste en une onde se situant entre le complexe QRS et l'onde T (*Paff et Boucek, 1975*). Dans nos conditions de mesure, aucune onde n'est observable à cet endroit. Cependant, l'enregistrement du conotruncus isolé montre en effet une onde électrique lente et de faible amplitude (Figure 21).

Nous avons pu enregistrer et mesurer exactement les durées de dépolarisation et repolarisation de chaque partie du cœur. Bien que la durée de la dépolarisation auriculaire soit plus courte que l'intervalle PR, il est difficile de localiser précisément la fin de la repolarisation de l'oreillette sur l'ECG du cœur entier. Cette difficulté pourrait s'expliquer par une interférence avec le signal faible mais prolongé provenant du conotruncus (>300ms), ou par une différence de géométrie et de positionnement de l'oreillette par rapport aux électrodes (encombrement spatial du ventricule dans le cœur entier). De plus, la durée du QT mesurée sur l'ECG global est plus grande que celle mesurée sur l'électrogramme du ventricule. Cette différence pourrait également être due à l'onde du conotruncus, qui interférerait aussi avec la fin de la repolarisation ventriculaire et retarderait son retour apparent à la ligne isoélectrique.

Bien que plus résistant à l'hypoxie que le cœur adulte (*Lopaschuk et al., 1992*), le cœur embryonnaire répond très rapidement à l'absence totale d'oxygène. En effet, le manque d'oxygène entraîne très rapidement des arythmies survenant selon un ordre caractéristique (Figure 19). Les arythmies semblent avoir une origine essentiellement auriculaire et ressemblent à celles observées dans le cœur adulte. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'activité de l'oreillette isolée continue sous forme de bouffées durant l'anoxie et la réoxygénation alors que le ventricule s'arrête plus rapidement et reprend une activité plus tardivement que l'oreillette. Cependant, le cœur embryonnaire présente une plus faible diversité d'arythmies que le cœur adulte. En effet, aucune fibrillation, aucune dissociation électromécanique, aucune extrasystole ventriculaire, ni aucune conduction rétrograde n'ont été observée dans le modèle étudié. Il faut noter que l'activité sous forme de bouffées observée durant l'anoxie et en début de réoxygénation ressemble à l'activité spontanée

observée durant le développement normal d'embryons précoces de poulet (*Sakai et al., 1998*) ou dans des cardiomyocytes dérivés de cellules souches (*Gryshchenko et al., 1999*).

Bien qu'au stade de développement étudié, aucun tissu conducteur spécialisé n'existe, les troubles de conduction (blocs 2/1 à 3/2, Wenckebach, blocs de 3^{ème} degré) représentent la majorité des arythmies. Ces altérations de la conduction électrique pourraient refléter des modifications de l'état de phosphorylation des jonctions communicantes pendant l'anoxie-réoxygénation. En effet, les connexines (Cx), essentiellement Cx 43, sont déjà présentes à ce stade de développement (*Wiens et al., 1995*), et une altération de leur conductance pourrait être à l'origine du ralentissement de la conduction AV (augmentation de l'intervalle PR). Les blocs auriculo-ventriculaires pourraient également être dus à l'allongement de la dépolarisation du ventricule, reflétée par l'augmentation de la durée du QT. En effet, si cette dépolarisation se prolonge, l'impulsion de l'oreillette peut parvenir au ventricule durant sa période réfractaire, entraînant un bloc de conduction de 2^d degré. Ces deux phénomènes se combinant lors de la réoxygénation, pourraient expliquer la survenue de blocs AV et de Wenckebach.

L'enregistrement simultané de l'activité électrique et contractile permet de mesurer le délai électromécanique. Ce paramètre important de la fonction cardiaque est très sensible à l'absence et la réadmission de l'oxygène. Le délai électromécanique ventriculaire est plus affecté par l'anoxie et la réoxygénation que l'EMDa. Cette différence confirme la résistance de l'oreillette vis-à-vis de l'anoxie et les observations précédentes (*Rosa et al., 2003*). Les composants du couplage E-C (canaux calciques de type L, SERCA, et canaux sarcoplasmiques couplés aux récepteurs à ryanodine) sont présents et fonctionnels au stade étudié (*Tenthorey et al., 1998; Moorman et al., 2000*). L'ATPase du réticulum est exprimée plus fortement dans l'oreillette, et son expression est inhomogène dans le ventricule. La différence d'expression et de répartition de ces pompes pourrait en partie expliquer la sensibilité différentielle des deux chambres cardiaques à l'anoxie et la réoxygénation.

Les enregistrements réalisés dans les différentes chambres cardiaques ont permis de mettre en évidence que la rythmicité et les potentiels d'action étaient différemment affectés au cours de l'anoxie et de la réoxygénation dans l'oreillette, le ventricule et le conotruncus.

Nos résultats montrent donc qu'il existe une susceptibilité différentielle à l'anoxie dans le cœur embryonnaire, l'oreillette étant la plus résistante.

Les résultats obtenus suggèrent que le modèle *in vitro* du cœur embryonnaire peut apporter des informations importantes pour la compréhension de mécanismes pathologiques pendant la cardiogenèse. Ces informations peuvent être spécialement utiles dans le contexte actuel des progrès en cardiologie fœtale et périnatale.

II. Rôle du NO dans la récupération du couplage E-C ventriculaire

Ce travail a été publié dans *Molecular and Cellular Biochemistry* :

Maury JP, Sarre A, Terrand J, Rosa A, Kucera P, Kappenberger L and Raddatz E (2004) **Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide.** *Mol Cell Biochem* 265: 141-149.

II.1. *Introduction*

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle important dans la régulation du couplage excitation-contraction (E-C) (Hare, 2003). Le NO est produit dans le cœur embryonnaire de poulet en réponse à l'anoxie-réoxygénation essentiellement par la NOS inducible (iNOS) (Terrand et al., 2003). Le but de ce travail était donc d'étudier l'effet du NO endogène et exogène sur le couplage E-C du cœur en développement au cours de l'anoxie et de la réoxygénation.

II.2. *Résultats*

Durant l'anoxie-réoxygénation, l'EMDa variait peu alors que l'EMDv était fortement affecté (augmentation de 400% en début de réoxygénation), mais retrouvait sa valeur préanoxique au cours de la réoxygénation. Alors qu'un donneur de NO (DETA-NONOate) n'avait pas d'effet sur les paramètres fonctionnels préanoxiques, il améliorait significativement la récupération postanoxique de l'EMDv. Au contraire, l'inhibition non-spécifique des NOS par le L-NAME retardait sa récupération lors de la réoxygénation, sans effet sur les autres paramètres fonctionnels.

II.3. *Discussion*

Ce travail a permis de montrer l'importance du NO dans la récupération du couplage excitation-contraction. Cette étude a aussi confirmé que l'EMDv était plus sensible à l'anoxie que l'EMDa, et ce à 2 stades de développement, différents 24HH et 25HH. Ces

résultats soulignent la différence de sensibilité entre ces deux régions du cœur, comme cela a été suggéré dans les études précédentes (*Sedmera et al., 2002*).

Nos résultats ont permis de mettre en évidence un effet protecteur du NO exogène sur le couplage E-C et souligne l'importance du NO endogène dans la récupération postanoxique du myocarde ventriculaire, une des sources importantes du monoxyde d'azote étant la iNOS (*Terrand et al., 2003*). L'amélioration du couplage E-C par le NO observée au cours de la réoxygénation pourrait être partiellement due à la modulation des canaux couplés aux récepteurs à ryanodine présents dans le cœur embryonnaire (*Tenthorey et al., 1998*), dont la probabilité d'ouverture est augmentée par le NO, mais également à l'inhibition des canaux calciques de type L ou à la modulation des pompes SERCA du réticulum (*Hare, 2003*).

Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide

Philippe Maury,^{1,2} Alexandre Sarre,² Jérôme Terrand,² Antonio Rosa,^{1,2} Pavel Kucera,² Lukas Kappenberger¹ and Eric Raddatz²

¹Division of Cardiology, University Hospital; ²Institute of Physiology, Faculty of Medicine, Lausanne, Switzerland

Received 7 August 2003; accepted 19 March 2004

Abstract

Background/Aim. Excitation–contraction coupling is modulated by nitric oxide (NO) which otherwise has either beneficial or detrimental effects on myocardial function during hypoxia-reoxygenation. This work aimed at characterizing the variations of electromechanical delay (EMD) induced by anoxia-reoxygenation within the developing heart and determining whether atrial and ventricular EMD are modulated by NO to the same extent. **Methods.** Hearts of 4 or 4.5-day-old chick embryos were excised and submitted *in vitro* to normoxia (45 min), anoxia (30 min) and reoxygenation (60 min). Electrocardiogram and atrial and ventricular contractions were simultaneously recorded throughout experiment. Anoxia-reoxygenation-induced chrono-, dromo- and inotropic disturbances and changes in EMD in atrium (EMDa) and ventricle (EMDv) were investigated in control hearts and in hearts exposed to 0.1, 1, 10, 50 and 100 μM of DETA-NONOate (a NO donating agent) or to 50 μM of L-NAME (a NOS inhibitor). **Results.** Under normoxia, heart rate, PR interval, ventricular shortening velocity, EMDa and EMDv were similar in control, L-NAME-treated and DETA-NONOate-treated hearts. Under anoxia, cardiac activity became markedly erratic within less than 10 min in all groups. At the onset of reoxygenation, EMDv was increased by about 300% with respect to the preanoxic value while EMDa did not vary significantly. Compared to control conditions, L-NAME or DETA-NONOate had no influence on the negative chrono-, dromo- and inotropic effects induced by anoxia-reoxygenation. However, L-NAME prolonged EMDv during anoxia and delayed EMDv recovery during reoxygenation while 100 μM DETA-NONOate had the opposite effects. EMDa was neither affected by NOS inhibitor nor NO donor. At the end of reoxygenation, all the investigated parameters returned to their basal values. **Conclusion.** This work provides evidence that a NO-dependent pathway is involved in regulation of the ventricular excitation-contraction coupling in the anoxic-reoxygenated developing heart. (*Mol Cell Biochem* **265**: 141–149, 2004)

Key words: hypoxia, reoxygenation, excitation–contraction coupling, atrium, ventricle, nitric oxide donor, chick embryo, NOS inhibitor

Introduction

Early cardiogenesis and embryonic cardiovascular function can be significantly impaired by chronic hypoxia although

the developing heart relies mostly on glycolytic metabolism for energy production [1–4]. The embryonic/fetal heart can also rapidly and markedly react to a short episode of anoxia

followed by reoxygenation with characteristic disturbances of rhythmicity, conduction and contractility [5–8], a pathological situation which might be observed at the time of a transient uteroplacental ischemia [9]. Besides the chronotropic and inotropic parameters, the electromechanical delay (EMD) as well represents an important functional index reflecting the efficiency of the cardiac excitation–contraction (E-C) coupling. Furthermore, E-C coupling could be specially affected by oxygen deprivation and readmission because the post-ischemic electrical recovery of cardiomyocytes appears to be more rapid than contractile recovery [10].

It is generally accepted that myocardial Ca^{++} -induced Ca^{++} release (CICR), calcium cycling, contractility and mitochondrial respiration are modulated by nitric oxide (NO) produced by distinct NO synthases (NOS) localized to sarcoplasmic reticulum, sarcolemmal membrane and mitochondria [11–14]. Otherwise NO may have either beneficial or detrimental effects on cardiac function during hypoxia-reoxygenation [15–22] and has been proposed as a preconditioning signal [23, 24]. On the other hand, exogenous NO-donating agents are known to have protective effects in reoxygenated cardiomyocytes [17] and in a number of cardiovascular diseases [25].

In the embryonic heart, in which endothelial (eNOS) and inducible NOS (iNOS) are strongly expressed [11, 26–28], NO appears to modulate cholinergic and/or adrenergic signaling [29] whereas an excessive NO production in ventricular myocytes has depressant effects [30]. However, the precise role that endogenous and exogenous NO could play in the function of the developing heart under pathological conditions remains unknown. We have recently shown, in the embryonic chick heart, that iNOS-produced NO or exogenously NO provided at micromolar concentration, have only slight effects on early post-anoxic recovery of parameters including heart rate, atrio-ventricular propagation and ventricular contractility [26]. However, whether the NO-dependent modulation of E-C coupling play a role in cardiac performances during anoxia-reoxygenation remains to be determined. It should be noticed that the CICR mechanism is functional early during cardiogenesis [7, 31, 32] although the transverse tubules and sarcoplasmic reticulum are sparse [33].

The spatio-temporal pattern of E-C coupling regulation by NO is rarely considered in studies dealing with myocardial ischemia–reperfusion injury. Nevertheless, some differential sensitivity to NO during anoxia-reoxygenation is expected within the embryonic heart. Indeed, compared with the ventricle, anoxic tolerance [8], glycogen content [34, 35], oxidative and glycogenolytic capacities [34] and expression of sarcoplasmic Ca^{++} -ATPase [31] and fast alpha myosin heavy chain [36, 37] are the highest in atrial myocardium. Also, atrial myocytes show a shorter action potential amplitude and duration [38–40] and a higher sensitivity to adenosine [41],

an important regulator of embryonic/fetal cardiac function during hypoxic stress [42].

The aim of the present work was to determine the variations of electromechanical delay and the influence of endogenous and exogenous NO in atrium and ventricle of the anoxic-reoxygenated embryonic chick heart.

Preliminary results of the present study have appeared as abstract [43].

Material and methods

Chemicals

All the standard chemicals and N^{G} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were purchased from Sigma. The NO donor DETA-NONOate (Z)-1-[2-(2-aminoethyl)-N-(ammonio-ethyl)amino]diazonium-1,2-diolate was purchased from ALEXIS Biochemicals Corporation (Lausen, Switzerland).

Preparation of the hearts

Fertilized eggs from Lohman Brown hens were incubated 4 or 4.5 days at 37.5 °C and 90% relative humidity up to stage 24 HH or 25 HH according to Hamburger and Hamilton [44], respectively. Whole hearts were dissected from the embryo and mounted in an airtight stainless steel chamber following the previously published procedures [45]. The spontaneously beating heart was carefully excised, placed in the culture compartment (300 μl) of the chamber provided with two windows for observation and measurements and maintained under controlled metabolic conditions on the thermostabilized stage (37 °C) of an inverted microscope (IMT2 Olympus, Tokyo, Japan) as previously described in details [5, 8]. The culture compartment was separated from the gas compartment by a thin (15 μm) transparent and gas-permeable silicone membrane (RTV 141, Rhône-Poulenc, Lyon, France). Thus, tissue PO_2 could be strictly controlled and rapidly modified (within seconds) by flushing gas of selected composition through the gas compartment. At these developmental stages, the heart lacks vascularization and the myocardial oxygen requirement is met exclusively by diffusion. The heart was always positioned in the culture compartment in the same manner, i.e. atrium upward and conotruncus downward, in order to limit the possible effects of cardiac geometry on the electrical and mechanical signals.

The standard HCO_3/CO_2 buffered medium was composed of (in mmol/L): 100 NaCl; 0.3 NaH_2PO_4 ; 10 NaHCO_3 ; 4 KCl; 0.79 MgCl_2 ; 1.5 CaCl_2 ; 8 D+glucose. This culture medium containing the heart was equilibrated in the chamber with 2.31% CO_2 in air (normoxia and reoxygenation) or in N_2 (anoxia) yielding a pH of 7.4.

In vitro recording of electrocardiogram (ECG) and cardiac contractions

ECG recording of the spontaneously contracting heart was performed using two Ag/AgCl electrodes (diameter 0.6 mm, 1 mm apart) inserted into the window facing the culture compartment. The atrial and ventricular regions were placed in the immediate vicinity of these electrodes which were connected to a differential preamplifier (gain 1000 \times), resulting in an output signal ranging between 1 and 2 Volts peak to peak. This signal was digitized and processed using an Apple Macintosh computer.

Contractions at the level of the atrium and the apex of the ventricle were optically detected as edge motion of the myocardial wall using a computerized microphotometric technique as previously described in detail [5, 8]. Briefly, two adjustable phototransistors were positioned over the projected image of the contracting atrium and ventricle and were connected to the computer via an analog to digital converter. The actual distance between the investigated atrial and ventricular regions was the same in control and treated hearts at stage 24 HH (2.3 ± 0.2 mm; $n = 30$) and at stage 25HH (2.9 ± 0.3 mm; $n = 17$). ECG and contractions were recorded simultaneously with a sampling resolution of 3 ms.

Functional parameters

The simultaneous recordings of electrical and contractile activities allowed to determine: atrial rate (beats/min); atrioventricular delay determined as interval (ms) between onsets of P and QRS waves (PR interval); atrial (EMDa) and ventricular (EMDv) electromechanical delays (ms) as measured between onsets of P or QRS wave and atrial or ventricular contractions, respectively; ventricular shortening (S , μm) in the apex vicinity was determined from video recordings; maximal shortening velocity (dS/dt , mm/s) as previously described [5, 8].

Protocol of anoxia-reoxygenation

After 30–45 min of stabilization under normoxia, control, L-NAME-treated and DETA-NONOate-treated hearts were submitted to anoxia during 30 min and reoxygenated during 60 min. L-NAME (50 μM) or DETA-NONOate (ranging from 0.1 to 100 μM) were present throughout the experiments.

The chrono-, dromo- and inotropic responses of control, L-NAME-treated and DETA-NONOate-treated hearts to anoxia-reoxygenation were determined, with special attention to electromechanical delay in atrium and ventricle.

Statistical analysis

All values are reported as mean \pm standard deviation (S.D.), unless otherwise indicated. The significance of any difference between the functional parameters of control and treated hearts was assessed with ANOVA in combination with Tukey test. ANOVA with repeated measures was used to compare recovery rates of the investigated parameters during reoxygenation. Two-tailed unpaired or paired Student's- t test was used for other comparisons. The statistical significance was defined by a value of $p \leq 0.05$.

This investigation conforms with the recommendation from the Declaration of Helsinki and the Guiding Principles in Care and Use of Animals.

Results

Spontaneous electrical and contractile activities

Representative ECG and atrial and ventricular shortenings of the isolated embryonic heart are shown in Fig. 1. Under normoxic steady-state, spontaneous electrical and contractile activities were regular and stable for at least 3 h under our experimental conditions (not shown).

Normoxic baseline cardiac performances

At each investigated stage, the functional parameters of DETA-NONOate-treated (Tables 1, 2 and 3) and the L-NAME-treated (Table 3) hearts determined during the pre-anoxic stabilization were comparable to their respective controls. Interestingly, EMDv increased by 75% between stage 24 and 25HH (i.e. within 12 h), while EMDa remained stable (Tables 1 and 2).

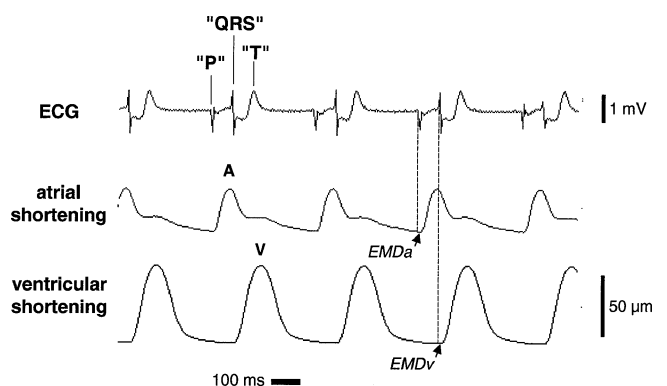


Fig. 1. Example of simultaneous recordings of spontaneous electrical and contractile activities of the isolated embryonic chick heart under normoxia. Stage 25 HH; Systolic peak of shortening in atrium (A) and ventricle (V); EMDa and EMDv: atrial and ventricular electromechanical delay, respectively.

Table 1. Functional parameters of hearts isolated from 4-day-old chick embryos (Stage 24 HH) and submitted to anoxia-reoxygenation were not altered by DETA-NONOate concentrations ranging from 0.1 to 50 μM . Parameters were determined under preanoxia (PRE), after 3 min of anoxia (AN3) and after 15 min (RO15) and 60 min (RO60) of reoxygenation. DETA-NONOate was present throughout the experiments. Mean \pm S.D. $n = 4$ for each experimental condition. EMD: electromechanical delay. #: $p < 0.02$ vs. control atrial EMD, two-tailed paired Student's t -test

		Deta-NONOate				
		Control	0.1 μM	1 μM	10 μM	50 μM
Heart rate (beats/min)	PRE	168 \pm 14	187 \pm 24	166 \pm 8	144 \pm 10	178 \pm 30
	AN3	145 \pm 36	178 \pm 26	147 \pm 49	130 \pm 32	122 \pm 10
	RO15	186 \pm 17	218 \pm 40	181 \pm 20	165 \pm 3	202 \pm 24
	RO60	176 \pm 11	181 \pm 37	176 \pm 9	164 \pm 10	175 \pm 22
PR interval (ms)	PRE	127 \pm 11	109 \pm 20	127 \pm 13	105 \pm 8	122 \pm 13
	AN3	141 \pm 13	139 \pm 5	155 \pm 16	130 \pm 19	151 \pm 24
	RO15	151 \pm 11	133 \pm 24	135 \pm 15	146 \pm 11	149 \pm 21
	RO60	131 \pm 9	119 \pm 29	118 \pm 5	117 \pm 9	128 \pm 15
Atrial EMD (ms)	PRE	14 \pm 2	11 \pm 4	13 \pm 2	10 \pm 4	14 \pm 2
	AN3	19 \pm 3	13 \pm 3	13 \pm 3	13 \pm 4	19 \pm 6
	RO15	16 \pm 4	14 \pm 4	16 \pm 4	13 \pm 2	18 \pm 6
	RO60	10 \pm 4	14 \pm 2	13 \pm 2	11 \pm 3	14 \pm 2
Ventricular EMD (ms)	PRE	10 \pm 2 #	8 \pm 2	7 \pm 2	8 \pm 5	9 \pm 4
	AN3	14 \pm 2	13 \pm 2	15 \pm 3	18 \pm 11	19 \pm 0
	RO15	19 \pm 4	12 \pm 4	14 \pm 2	14 \pm 2	11 \pm 4
	RO60	11 \pm 4	10 \pm 4	9 \pm 2	12 \pm 5	9 \pm 6
Shortening velocity (mm/s)	PRE	1.6 \pm 1.1	0.8 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	2.3 \pm 1.7	1.8 \pm 1.1
	AN3	0.8 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2	1.8 \pm 1.7	0.8 \pm 0.6
	RO15	0.7 \pm 0.3	0.8 \pm 0.7	0.6 \pm 0.4	1.1 \pm 1.2	1.3 \pm 1.2
	RO60	1.6 \pm 1.2	0.8 \pm 0.7	1.0 \pm 0.5	1.9 \pm 1.1	1.4 \pm 0.7

Chrono-, dromo- and inotropic responses to anoxia-reoxygenation

The anoxia-reoxygenation-induced changes in atrial rate, atrioventricular conduction (PR interval), EMDa, EMDv and ventricular maximal shortening velocity are reported in

Table 2. Preanoxic baseline functional parameters in control ($n = 8$) and DETA-NONOate-treated ($n = 9$) hearts as determined *in vitro*. Stage 25 HH; mean \pm S.D.; AV: Atrioventricular; EMD: Electromechanical delay

	Control	Deta-NONOate (100 μM)
Heart rate (beats/min)	147 \pm 30	155 \pm 43
PR interval (ms)	121 \pm 22	116 \pm 32
Atrial EMD (ms)	16 \pm 2.5	14 \pm 2.3
Ventricular EMD (ms)	17.9 \pm 3.8	16.6 \pm 3.4
Shortening velocity (mm/s)	3.1 \pm 2.0	2.3 \pm 0.9

Tables 1 and 3 and illustrated in Fig. 2. Under anoxia, cardiac function progressively collapsed and activity became markedly erratic within less than 10 min in all experimental groups. During reoxygenation, all functional parameters progressively returned to their baseline normoxic values and activity of all hearts was restored after about 30 min. This pattern of response to oxygen deprivation and readmission was the same at stage 24 and 25 HH, which is illustrated by the comparison between rates of recovery of EMDa and EMDv at the two stages (Table 4) and confirms our previous observations [8, 26, 46].

Changes in electro-mechanical delay during anoxia-reoxygenation

EMDa did not vary significantly throughout anoxia-reoxygenation whereas EMDv was markedly affected, reaching four-fold its preanoxic value at the onset of reoxygenation Fig. 3). EMDv recovered its preanoxic level after about 30 min of reoxygenation.

Table 3. Effects of NOS inhibition with L-NAME (50 μ M) on the functional parameters of the embryonic chick heart (Stage 24 HH) determined under preanoxia (PRE), after 3 min of anoxia (AN3) and after 15 min (RO15) and 60 min (RO60) of reoxygenation. L-NAME significantly delayed ventricular EMD recovery during reoxygenation but affect none of the other investigated parameters. L-NAME was present throughout the experiments. Mean \pm S.D. Control: $n = 6$; L-NAME: $n = 4$; *: $p < 0.04$ versus control ventricular EMD, two-tailed unpaired Student's t -test. Stage 24 HH; #: $p < 0.04$ versus control atrial EMD, two-tailed paired Student's t -test

		Control	L-NAME
Heart rate (beats/min)	PRE	151 \pm 24	162 \pm 12
	AN3	113 \pm 45	115 \pm 36
	RO15	188 \pm 33	178 \pm 31
	RO60	170 \pm 19	168 \pm 10
	PR interval (ms)	PRE	133 \pm 25
	AN3	142 \pm 38	169 \pm 59
	RO15	157 \pm 50	159 \pm 19
	RO60	121 \pm 24	135 \pm 14
Atrial EMD (ms)	PRE	17 \pm 4	18 \pm 3
	AN3	18 \pm 5	18 \pm 5
	RO15	16 \pm 5	19 \pm 3
	RO60	12 \pm 7	10 \pm 1
Ventricular EMD (ms)	PRE	10 \pm 3#	13 \pm 3
	AN3	14 \pm 3	21 \pm 6*
	RO15	12 \pm 6	25 \pm 7*
	RO60	8 \pm 2	16 \pm 6*
Shortening velocity (mm/s)	PRE	1.5 \pm 1.3	0.6 \pm 0.3
	AN3	0.9 \pm 1.1	0.3 \pm 0.1
	RO15	0.6 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3
	RO60	1.4 \pm 1.4	0.7 \pm 0.4

Effects of exogenous and endogenous NO on electromechanical delay

During anoxia-reoxygenation, DETA-NONOate, whatever the concentration used, had no significant effect on atrial

Table 4. Atrial and ventricular electromechanical delay (EMD) at Stage 24 and 25 HH expressed as % of the preanoxic values after 3 min of anoxia (AN3) and after 15 min (RO15) and 60 min (RO60) of reoxygenation. There was no difference between Stage 24 and 25 HH, indicating that the recovery rate of EMDs was comparable at these two developmental stages. Mean \pm S.D. $n = 4$ at Stage 24 HH; $n = 8$ at Stage 25 HH

	Atrial EMD		Ventricular EMD	
	Stage 24 HH	Stage 25 HH	Stage 24 HH	Stage 25 HH
AN3	133 \pm 12%	152 \pm 41%	158 \pm 50%	168 \pm 50%
RO15	115 \pm 27%	83 \pm 24%	228 \pm 86%	204 \pm 91%
RO60	83 \pm 24%	84 \pm 28%	125 \pm 35%	113 \pm 44%

beating rate, PR interval, ventricular maximal shortening velocity and EMDa (Table 1, Figs. 2 and 4). In contrast, hearts treated with 100 μ M of DETA-NONOate showed a shorter EMDv under anoxia and a faster return of EMDv to basal value during reoxygenation than control hearts (Fig. 4). At 50 μ M, DETA-NONOate had a tendency to also ameliorate EMDv recovery to the same extent (by about 40%), but statistically not significant with ANOVA (Table 1). Furthermore, inhibition of NOS activity with L-NAME severely delayed EMDv recovery but had no influence on EMDa or other parameters (Table 3).

Discussion

The chrono-, dromo- and inotropic responses to anoxia-reoxygenation observed in this work are characteristic of the isolated embryonic heart and were investigated under strictly controlled metabolic conditions and PO₂ and PCO₂ levels, as previously discussed in great details [5, 6, 8, 46]. As we recently reported [46], ventricular shortening velocity displayed important interindividual variations, compared with

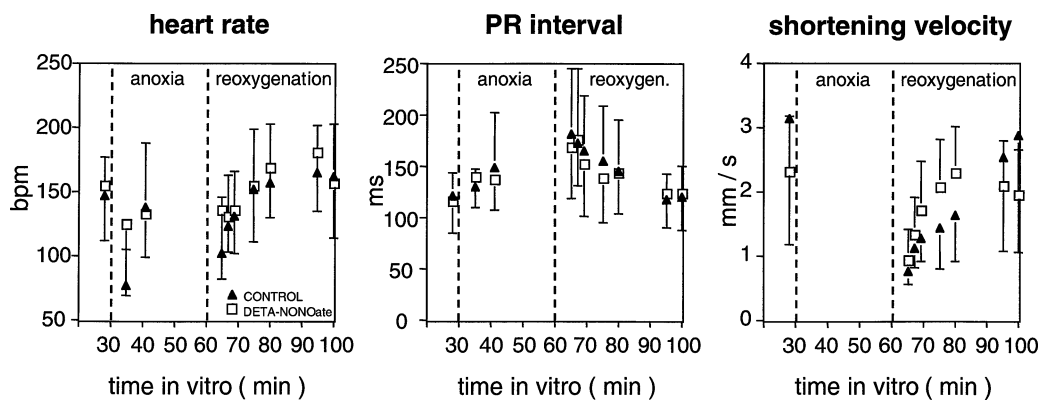


Fig. 2. Anoxia-reoxygenation-induced changes in heart rate, PR interval and ventricular maximal shortening velocity were not altered by the NO donor DETA-NONOate (100 μ M). Stage 25 HH. Mean \pm S.D.; control $n = 8$; DETA-NONOate $n = 9$.

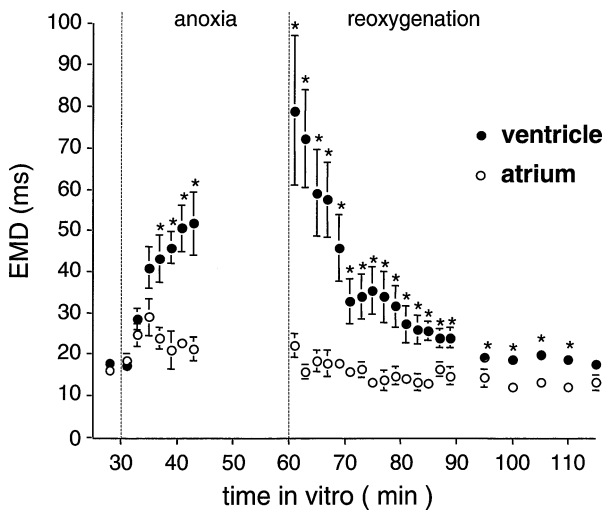


Fig. 3. Variations of the electromechanical delay (EMD) in atrium and ventricle during anoxia-reoxygenation in control hearts ($n = 8$). Ventricular EMD was the most altered. Stage 25 HH; mean \pm S.E.M.; *: $p < 0.05$ vs. atrium; ANOVA with repeated measures during reoxygenation: $p < 0.005$.

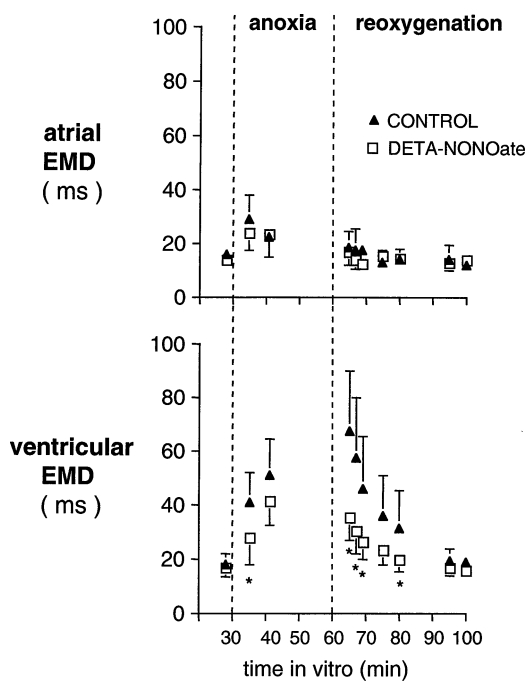


Fig. 4. During anoxia-reoxygenation, NO donor DETA-NONOate ($100 \mu\text{M}$) significantly shortened electromechanical delay (EMD, ms) in ventricle but not in atrium. Stage 25 HH; control $n = 8$, DETA-NONOate $n = 9$; mean \pm S.D.; *: $p < 0.05$ versus control; ANOVA with repeated measures during reoxygenation: $p < 0.005$.

other investigated parameters. This variability, observed both in untreated and treated groups, might be due to slight differences in developmental stage, variations of cardiac three-dimensional structure and/or degree of flattening of the hearts

in the culture compartment. Also, the function of the isolated embryonic heart is known to be specially affected by changes in mechanical loading conditions.

Electromechanical delay (EMD) in atrium and ventricle during anoxia-reoxygenation

The EMD, reflecting the efficiency of E-C coupling, represents an important functional index to evaluate the degree of myocardial injury. The technique of simultaneous recording of electrical and contractile activities in the chambers of the developing heart has allowed to characterize for the first time the spatio-temporal pattern of electromechanical disturbances induced by anoxia-reoxygenation and the protective role played by NO. Boucek *et al.* [47] determined electromechanical delays in normoxic heart isolated from 3-day-old chick embryo and found 29 ± 9 and 35 ± 9 ms in atrium and ventricle, respectively. The discrepancy between these values and ours could be due to developmental difference (stage 20 HH vs. 24 HH), to the techniques used for recording contractions (myograph vs. photometry) and to temperature difference (29 vs. 37°C). These authors also concluded that atrium consistently had the shortest EMD, which was also the case in our preparation but only during anoxia and reoxygenation and not during steady normoxia. The possibility that the observed changes in EMDa or EMDv reflected variations of intra-atrial or intra-ventricular conduction velocities or were due to some functional inhomogeneity along the heart tube can be ruled out. Indeed, significant enlarging of the P and QRS waves evoking a decrease in conduction velocity was not observed and the values of EMDv determined at different levels along the ventricle wall were comparable (not shown).

In the embryonic heart, although the velocity of contraction (high-fast- α myosin heavy chain) and the clearance of calcium (high SERCA2) are more rapid in atrium than in ventricle [31, 36], the baseline normoxic values of EMDa and EMDv were found rather close. In contrast, during anoxia-reoxygenation, only EMDv was subjected to important variations, which is confirmed by our recent study [46].

We have also reported that during reoxygenation of the embryonic chick heart, (1) atrial arrhythmias appear to result from excessive activation of L-type Ca^{++} channels and ryanodine receptors [7], (2) atrial activity resumes first [6], (3) shortening recovers more rapidly in atrium than in ventricle [8], and (4) there is a regional heterogeneity of oxidative stress [48]. On the other hand, NO and oxyradicals, endogenously produced or exogenously provided, are known to directly or indirectly modify calcium-handling proteins such as L-type Ca^{++} channels and ryanodine receptors, e.g. NO may augment open probability of the ryanodine receptors and decrease that of L-type Ca^{++} channels [13]. These observations

suggest that subtle regional differences in the mechanisms underlying E-C coupling could exist within the embryonic heart and that Ca^{++} -induced Ca^{++} release and/or myofilaments present a differential sensitivity to anoxia-reoxygenation injury and to NO modulation in atrium and ventricle.

The three-dimensional organization of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum membrane, as well as the kinetics of Ca^{++} distribution upon activation, are not the same in atrial and ventricular adult myocytes [49], which also might be the case in the developing heart. Moreover, efficiency of E-C coupling appears to be under the control of mechanisms utilizing ATP derived preferentially from glycolysis [49]. Accordingly, the fact that glycogenolytic capacity is lower in ventricle than in atrium of the embryonic chick heart [34] could partly explain why EMDv was the most altered during anoxia-reoxygenation and its recovery was far less rapid than EMDa.

Thus, the differential alterations of EMD induced by anoxia-reoxygenation in atrium and ventricle probably reflect a multifaceted phenomenon which deserves to be investigated at the cellular and molecular levels.

Differential effects of NO donating agent

To our knowledge, this is the first time that a differential sensitivity of E-C coupling to exogenously provided NO is observed and a dose-response is established in the developing heart. The donor DETA-NONOate has been used because it has a longer half-life time of NO release, i.e. about 20 h in aqueous solution [50], than most of the NO donors, assuring a rather steady-state release of NO in the culture medium throughout the experiments. The lowest NO donor concentration tested in this work ($0.1 \mu\text{M}$) corresponded to that required to activate the soluble guanylate cyclase [51]. The NO donor appeared to improve postanoxic recovery of EMDv from a concentration of $50 \mu\text{M}$, while lower concentrations had no observable effects. Alterations induced by this donor were specifically due to the release of NO and not to an unspecific effect of the molecule itself. Indeed, we recently showed that denaturated (spent) DETA-NONOate at $100 \mu\text{M}$ had no effect on the functional parameters with respect to control conditions [26]. It is also relevant to note that in recent pilot experiments we found that levels of protein nitration (i.e. nitrotyrosine formation assessed by immunoblot assay) were not increased in 4-day-old embryonic chick hearts even after 3 h of exposure to $100 \mu\text{M}$ DETA-NONOate, indicating that such a high dose did not induce a significant myocardial nitrosative stress (Raddatz and Markert, unpublished data). The absence of toxicity of DETA-NONOate at high dose is also corroborated by the fact that cardiac function fully recovered at the end of reoxygenation in both control and treated groups.

Differential effects of endogenously released NO

The endothelial and inducible isoforms of NOS are strongly expressed and active in the embryonic chick heart [26, 27, 28] but their involvement in modulation of E-C coupling remains unclear. Endogenously derived NO does not seem to play a prominent regulatory role under baseline normoxic conditions as neither L-NAME (this work) nor L-NIO [26] affected the investigated parameters. By contrast, throughout anoxia-reoxygenation, inhibition of NOS activity had no effect on sinoatrial pacemaking activity, atrio-ventricular propagation, shortening velocity and incidence of arrhythmias (not shown), but markedly and selectively retarded the postanoxic recovery of ventricular electromechanical delay.

Recently, we have shown that both endogenous production of NO (mainly iNOS-derived) [26] and reactive oxygen species (ROS) are increased by anoxia-reoxygenation [48]. An imbalance between NO and ROS production, specially during the first 15 min of reoxygenation when the burst of ROS is observed [48, 52], may cause damage to myofilaments [53] and proteins involved in E-C coupling [13]. Interestingly, EMDv was the most altered, and its protection by DETA-NONOate the most marked, during the same early phase of reoxygenation (Figs. 3 and 4). Because NO has important antioxidant properties [51, 54, 55], it appears reasonable to speculate that endogenously released (i.e. L-NAME-inhibitable) and/or exogenously provided NO (i.e. DETA-NONOate) could compensate for the deleterious effects of overwhelming ROS at the level of the Ca^{++} handling proteins. These antioxidant properties combined with the calcium-lowering effect of NO [28] through the control of L-type Ca^{++} current [56] (which significantly contribute to Ca^{++} transient in embryonic cardiomyocytes [7]), could protect CICR and contractile machinery specially in the ventricle.

Surprisingly, atrial activity appears to remain much less responsive to comparable concentrations of NO and to NOS inhibitor. These findings are in line with our previous studies showing that atrium of the embryonic chick heart is more tolerant to stress than ventricle [5, 8, 26, 34]. Finally, it should be mentioned that during the second half of intrauterine development of the rat, iNOS and eNOS are downregulated to a greater degree in ventricle than in atria, suggesting that levels of NOS expression and activity can vary in space and time [11], which could partly explain the NO-related regional difference observed in this work.

Conclusion

Our data suggest that a NO signaling pathway plays a predominant role in regulation of E-C coupling in the embryonic heart, specially in the ventricular myocytes when they

are submitted to oxygen deprivation and readmission. Furthermore, the facts that the disturbances of E-C coupling and the beneficial effect of exogenous NO were essentially restricted to the ventricle, indicate that a characteristic pattern of differential sensitivity to anoxia-reoxygenation injury establishes early during cardiogenesis. The molecular mechanisms whereby postanoxic recovery of E-C coupling in the developing heart is improved by NO remain unknown and deserve to be explored as it may present a certain clinical and therapeutic interest.

Acknowledgements

The skilful technical assistance of Michel Jadé, Christian Häberli and André Singy and the collaboration of Kathya Prêtre and Nathalie Jurisch are gratefully acknowledged. This work was supported by the Fondation Suisse de Cardiologie and the Theo Rossi di Montelera Foundation.

References

- Grabowski CT, Schroeder RE: A time-lapse photographic study of chick embryos exposed to teratogenic doses of hypoxia. *J Embryol Exp Morph* 19: 347–362, 1968
- Jaffee OC: Hemodynamics and cardiogenesis. The effects of physiologic factors on cardiac development. *Birth Defects* 14: 393–404, 1978
- Ostadal B, Ostadalova I, Dhalla NS: Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency: Comparative and ontogenetic aspects. *Physiol Rev* 79: 635–659, 1999
- Mulder ALM, Van Goor CA, Giussani DA, Blanco CE: Alpha-adrenergic contribution to the cardiovascular response to acute hypoxemia in the chick embryo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R2004–R2010, 2001
- Raddatz E, Kucera P, de Ribaupierre Y: Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation: An *in vitro* model. *Exp Clin Cardiol* 2: 128–134, 1997
- Meiltz A, Kucera P, de Ribaupierre Y, Raddatz E: Inhibition of bicarbonate transport protects embryonic heart against reoxygenation-induced dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 30: 327–335, 1998
- Tenthorey D, de Ribaupierre Y, Kucera P, Raddatz E: Effects of verapamil and ryanodine on activity of the embryonic chick heart during anoxia and reoxygenation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 195–202, 1998
- Sedmera D, Kucera P, Raddatz E: Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R379–R388, 2002
- Fantel AG, Mackler B, Stamps LD, Tran TT, Person RE: Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues. *Free Rad Biol Med* 25: 95–103, 1998
- Louch WE, Ferrier GR, Howlett SE: Changes in excitation–contraction coupling in an isolated ventricular myocyte model of cardiac stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H800–H810, 2002
- Bloch W, Addicks K, Hescheler J, Fleischmann BK: Nitric oxide synthase expression and function in embryonic and adult cardiomyocytes. *Microsci Res Technol* 55: 259–269, 2001
- Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM: Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling. Independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res* 92: 1322–1329, 2003
- Hare JM: Nitric oxide and excitation–contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 35: 719–729, 2003
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand J-L: Nitric oxide and cardiac function. Ten years after, and continuing. *Circ Res* 93: 388–398, 2003
- Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM: The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 86: 279–288, 1992
- Depré C, Vanoverschelde J-L, Goudemant J-F, Mottet I, Hue L: Protection against ischemic injury by nonvasoactive concentrations of nitric oxide synthase inhibitors in the perfused rabbit heart. *Circulation* 92: 1911–1918, 1995
- Schlüter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM: Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol* 271: H428–H434, 1996
- Mizuno T, Watanabe M, Sakamoto M, Sunamori M: L-arginine, a nitric oxide precursor, attenuates ischemia–reperfusion injury by inhibition inositol-1,4,5-triphosphate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115: 931–936, 1998
- Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC: Myocardial ischemia/reperfusion injury in the inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Life Sci* 65: 935–945, 1999
- Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, Laplace M, Depond S, Adnot S, Crozatier B: Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1697–1708, 1999
- Agullo L, Garcia-Dorado D, Inserte J, Paniagua A, Pyrhonen P, Llevadot J, Soler-Soler J: L-arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia–reoxygenation by a cCMP-dependent mechanism. *Am J Physiol* 276: H1574–H1580, 1999
- Shah AM, MacCarthy PA: Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Therap* 86: 49–86, 2000
- Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV: Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1159–1167, 2000
- 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
- Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J: Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide—An overview. *Circ Res* 90: 21–28, 2002
- Terrand J, Felley-Bosco E, Courjault-Gautier F, Rochat A-C, Kucera P, Raddatz E: Postanoxic functional recovery of the developing heart is slightly altered by endogenous or exogenous nitric oxide. *Mol Cell Biochem* 252: 53–63, 2003
- Ungureanu-Longrois D, Bézie Y, Perret C, Laurent S: Effects of exogenous and endogenous nitric oxide on the contractile function of cultured chick embryo ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 677–687, 1997
- Shimizu T, Kinugawa K-I, Sugishita Y, Sugishita K, Harada K, Matsui H, Kohmoto O, Serizawa T, Takahashi T: Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase in chick embryonic ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 38: 405–413, 1998
- Ji GJ, Fleischmann BK, Bloch W, Feelisch M, Andressen C, Addicks K, Hescheler J: Regulation of the L-type Ca^{2+} channel during cardiomyogenesis: Switch from NO to adenylyl cyclase-mediated inhibition. *FASEB J* 13: 313–324, 1999
- Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, Yao A, Aoyagi T, Momomura S, Hirata Y, Serizawa T: Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res* 75: 285–295, 1994

31. Moorman AFM, Schumacher CA, De Boer PAJ, Hagoort J, Bezstarosti K, van den Hoff MJB, Wagenaar GTM, Lamers JMJ, Wuytack F, Christoffels VM, Fiolet JWT: Presence of functional sarcoplasmic reticulum in the developing heart and its confinement to chamber myocardium. *Dev Biol* 223: 279–290, 2000
32. Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Tsutsuura M, Kobayashi T, Namiki A, Tohse N: Fetal and postnatal development of Ca^{++} transients and Ca^{++} sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 58: 535–548, 2003
33. Tibbits GF, Xu LQ, Sedarat F: Ontogeny of excitation–contraction coupling in the mammalian heart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132: 691–698, 2002
34. Romano R, Rochat A-C, Kucera P, de Ribaupierre Y, Raddatz E: Oxidative and glycogenolytic capacities within the developing chick heart. *Pediatr Res* 49: 363–372, 2001
35. Lyon X, Kappenberger L, Sedmera D, Rochat A-C, Kucera P, Raddatz E: Pacing redistributes glycogen within the developing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33: 513–520, 2001
36. Moorman AFM, Lamers WH: Molecular anatomy of the developing heart. *Trends Cardiovasc Med* 4: 257–264, 1994
37. Franco D, Gallego A, Habets PEMH, Coma VS, Moorman AFM: Species-specific differences of myosin content in the developing cardiac chambers of fish, birds, and mammals. *Anat Rec* 268: 27–37, 2002
38. de Jong F, Opthof T, Wilde AAM, Janse MJ, Charles R, Lamers WH, Moorman AFM: Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. *Circ Res* 71: 240–250, 1992
39. Alanis J, Argüello C, Polo L: Effects of heparin on the electrophysiological and mechanical properties of early embryonic chick hearts. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2503–2511, 1997
40. Shrier A, Clay JR: Comparison of the pacemaker properties of chick embryonic atrial and ventricular heart cells. *J Membr Biol* 69: 49–56, 1982
41. Liang BT: Adenosine receptors and cardiovascular function. *Trends Cardiovasc Med* 2: 100–108, 1992
42. Porter GA, Rivkees SA: Ontogeny of humoral heart rate regulation in the embryonic mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R401–R407, 2001
43. Maury P, Terrand J, Rosa A, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E: Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide donor. *Basic Res Cardiol* 98(3): 191(Abstract), 2003
44. Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88: 49–92, 1951
45. Raddatz E, Servin M, Kucera P: Oxygen uptake during early cardiogenesis of the chick. *Am J Physiol* 262: H1224–H1230, 1992
46. Rosa A, Maury J-P, Terrand J, Lyon X, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E: Ectopic pacing at physiological rate improves postanoxic recovery of the developing heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2384–H2392, 2003
47. Boucek RJ, Murphy WP, Paff GH: Electrical and mechanical properties of chick embryo heart chambers. *Circ Res* VII: 787–793, 1959
48. Raddatz E, Rochat A-C: Heterogeneity of oxidant stress in the reoxygenated developing heart. *J Mol Cell Cardiol* 34(6): A52(Abstract), 2002
49. Hüser J, Wang YG, Sheehan KA, Cifuentes F, Lipsius SL, Blatter LA: Functional coupling between glycolysis and excitation–contraction coupling underlies alternans in cat heart cells. *J Physiol* 524(3): 795–806, 2000
50. Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM, Anderson PG: Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and *cytochrome c* release. *J Biol Chem* 275: 20474–20479, 2000
51. Wink DA, Mitchell JB: Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* 25: 434–456, 1998
52. Sarre A, Gabioud H, Lange N, Raddatz E: Eur. J. The mitochondrial KATP channel is not involved in the oxidative burst induced by anoxia-reoxygenation in the embryonic heart. *Heart Fail* 2(1): 90(Abstract), 2003
53. Gao WD, Liu Y, Marban E: Selective effects of oxygen free radicals on excitation–contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation* 94: 2597–2604, 1996
54. Wink DA, Vodovotz Y, Grisham MB, DeGraaf W, Cook JC, Pacelli R, Krishna M, Mitchell B: Antioxidant effects of nitric oxide. *Meth Enzymol* 301: 413–425, 1999
55. Halliwell B: Antioxidant defense mechanisms. From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31: 261–272, 1999
56. Gallo MP, Malan D, Bedendi I, Biasin C, Alloati G, Levi RC: Regulation of cardiac calcium current by NO and cGMP-modulating agents. *Pflugers Arch* 441: 621–628, 2001

III. Rôle des canaux K_{ATP} mitochondriaux (mito K_{ATP}) dans la récupération postanoxique

Ce travail a été publié dans *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*:

Sarre A, Lange N, Kucera P and Raddatz E (2005). **Mito K_{ATP} channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(4): H1611-1619.

III.1. Introduction

L'ouverture des canaux mito K_{ATP} peut améliorer la récupération post-ischémique de la fonction contractile du cœur adulte (*Forbes et al., 2001; Dos Santos et al., 2002; Das et Sarkar, 2003b; Das et Sarkar, 2003a; Feng et al., 2003; Uchiyama et al., 2003; Ono et al., 2004; Wakahara et al., 2004; Wang et al., 2004b; Kristiansen et al., 2005*), réduire la taille de l'infarctus (*Baines et al., 1999; Pain et al., 2000; Patel et Gross, 2001; Das et Sarkar, 2003b; Oldenburg et al., 2003; Uchiyama et al., 2003*) ou diminuer la mort de cellules en culture (*Akao et al., 2001; Das et Sarkar, 2003b; Ichinose et al., 2003; Lebuffe et al., 2003; Nagata et al., 2003; Facundo et al., 2005*).

Lebuffe et coll. ont montré dans des cardiomyocytes embryonnaires que les PKC étaient impliquées dans la diminution de la mort cellulaire induite par l'ouverture des canaux mito K_{ATP} (*Lebuffe et al., 2003*). Cependant, selon les modèles étudiés, les PKC joueraient un rôle soit en amont (*Lebuffe et al., 2003; Bouwman et al., 2004*), soit en aval des canaux mito K_{ATP} (*Liu et al., 2002; Harada et al., 2004; Moon et al., 2004*). Mais Lebuffe apportait une information supplémentaire. En effet, ce travail indique que le monoxyde d'azote est nécessaire à la protection apportée par l'ouverture des canaux mito K_{ATP} dans des cardiomyocytes ventriculaire d'embryons de poulet de 10 jours.

Cependant, rien n'était connu concernant la protection de la fonction électrique et contractile du cœur embryonnaire au stade précoce de développement.

III.2. Résultats

Dans le cœur embryonnaire de poulet au stade 24HH, l'activation pharmacologique des canaux mitoK_{ATP} par le diazoxide (50µM) permettait une amélioration de la récupération postanoxique du couplage excitation-contraction ventriculaire, et du délai auriculo-ventriculaire. La protection du couplage E-C était abolie par un piègeur de radicaux (MPG), un inhibiteur non-spécifique des PKC (chélérythrine) et un inhibiteur non-sélectif des NOS (L-NAME), alors que celle de la conduction AV était abolie exclusivement par l'inhibition des NOS.

III.3. Discussion

Nos résultats indiquent que les canaux mitoK_{ATP} demeurent fermés dans le cœur de l'embryon de poulet, même lors d'une anoxie de 30 minutes. Pourtant leur activation pharmacologique permet une amélioration de la récupération fonctionnelle postanoxique.

Notre étude a mis en évidence que le traitement du cœur immature par l'activateur des canaux K_{ATP} mitochondriaux, le diazoxide, pouvait améliorer la récupération du délai électromécanique ventriculaire mais également celle de la conduction auriculo-ventriculaire. L'absence de réseau coronaire dans le myocarde embryonnaire exclue toute effet vasculaire du traitement pharmacologique. Ainsi la protection observée dans ce travail ne peut pas être due à l'effet du diazoxide sur les canaux K_{ATP} de muscles lisses vasculaires qui aboutirait, chez l'adulte, à une vasodilatation coronaire.

Dans notre modèle, une production accrue de radicaux d'oxygène lors de la phase précoce de réoxygénation semble indispensable à la protection du couplage E-C, et non à une augmentation de ROS en normoxie. A l'inverse, le diazoxide appliqué avant l'ischémie chez l'adulte, augmente immédiatement la production radicalaire (Carroll *et al.*, 2001; Forbes *et al.*, 2001; Krenz *et al.*, 2002; Samavati *et al.*, 2002; Oldenburg *et al.*, 2003), et diminue la production de ROS à la reperfusion. Cependant, dans nos conditions, le diazoxide était présent avant, pendant et après l'anoxie. Les différences entre nos résultats et ceux obtenus avec les cardiomyocytes adultes pourraient s'expliquer en partie par la différence de

protocole, prétraitement chez l'adulte et traitement continu dans le cœur embryonnaire, mais aussi par une différence dans la maturité des mitochondries (*Sordahl et al., 1972; Warshaw, 1972*). La mesure de production radicalaire dans notre étude a été réalisée sur le ventricule d'un cœur entier battant spontanément, et non sur des cellules isolées en cultures. Le fait que le piègeur de radicaux MPG abolisse la protection apportée par l'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux indique clairement l'importance des radicaux dans cette protection.

L'inhibiteur des PKC, chélérythrine, abolit également cette protection. Ce résultat confirme le rôle de ces kinases dans l'effet protecteur de l'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux (*Liu et al., 2002; Harada et al., 2004; Moon et al., 2004*). L'absence de modification de la production radicalaire par la chélérythrine indique que l'activation des protéines kinases C est en aval des radicaux dans le cœur embryonnaire. L'effecteur final de cette protection n'est pas connu, mais tous les composants du couplage excitation-contraction sont présents à ce stade de développement et pourraient être des candidats. Cet aspect mérite quelques études complémentaires.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'importance du monoxyde d'azote dans la protection apportée par le diazoxide. Le L-NAME abolit à la fois la protection du couplage E-C et de la conduction lors de la réoxygénation. Ce résultat montre le rôle essentiel du NO endogène dans la récupération postanoxique et dans la protection fonctionnelle apportée par l'activation des canaux $mitoK_{ATP}$. A notre connaissance, aucun article ne renseigne sur une action directe du diazoxide ou du NO sur les connexines, bien que le préconditionnement ischémique augmente le niveau de phosphorylation de Cx43 (*Schulz et Heusch, 2004; Boengler et al., 2005*), et que celle-ci soit exprimée dans le cœur immature (*Wiens et al., 1995*).

L'ensemble de ces résultats a permis de proposer un modèle des voies de signalisation impliquées dans la protection induite par l'activation pharmacologique des canaux $mitoK_{ATP}$ par le diazoxide dans le cœur embryonnaire (Figure 22).

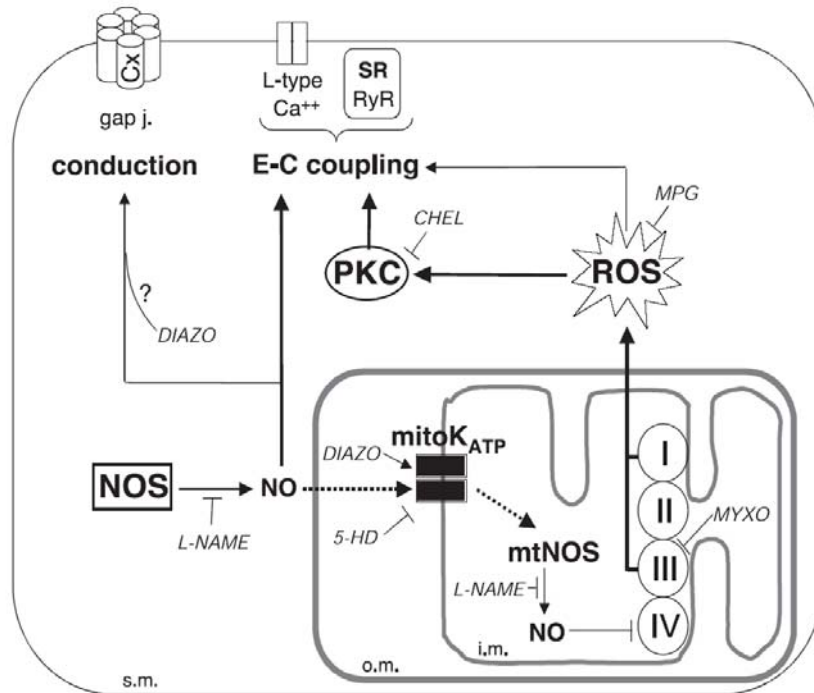


Figure 22 : Modèle basé sur les résultats du présent travail illustrant les relations entre les canaux $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, les monoxyde d'azote synthases cytosoliques et mitochondriales (NOS et mtNOS, respectivement), les radicaux mitochondriaux (ROS) et les PKC durant la récupération postanoxique. Gap j. : jonctions communicantes ; L-type Ca^{2+} : canaux calciques de type L ; RyR : canaux calciques couplés aux récepteurs à ryanodine ; SR : réticulum sarcoplasmique ; I-IV : complexes de la chaîne respiratoire ; s.m. : membrane du sarcolemme ; i.m. et o.m. : membrane interne et externe de la mitochondrie. Les agents pharmacologiques sont indiqués en italique ; DIAZO : diazoxide, CHEL : chélérythrine ; MYXO : myxothiazol. Les flèches indiquent une activation, les symboles en forme de T, une inhibition. (D'après la figure 7 de Sarre *et al.*, 2005b).

mitoKATP channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways

Alexandre Sarre, Norbert Lange, Pavel Kucera and Eric Raddatz

AJP - Heart 288:1611-1619, 2005. First published Nov 18, 2004; doi:10.1152/ajpheart.00942.2004

You might find this additional information useful...

This article cites 47 articles, 24 of which you can access free at:

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/288/4/H1611#BIBL>

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

<http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/full/288/4/H1611>

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

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

This information is current as of November 23, 2005 .

mitoK_{ATP} channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways

Alexandre Sarre,¹ Norbert Lange,² Pavel Kucera,¹ and Eric Raddatz¹

¹Department of Physiology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne; and

²Laboratory of Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy Geneva-Lausanne, Geneva, Switzerland

Submitted 9 September 2004; accepted in final form 13 November 2004

Sarre, Alexandre, Norbert Lange, Pavel Kucera, and Eric Raddatz. mitoK_{ATP} channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1611–H1619, 2005. First published November 18, 2004; doi:10.1152/ajpheart.00942.2004.—Whereas previous studies have shown that opening of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ (mitoK_{ATP}) channel protects the adult heart against ischemia-reperfusion injury, it remains to be established whether this mechanism also operates in the developing heart. Isolated spontaneously beating hearts from 4-day-old chick embryos were subjected to 30 min of anoxia followed by 60 min of reoxygenation. The chrono-, dromo-, and inotropic disturbances, as well as alterations of the electromechanical delay (EMD), reflecting excitation-contraction (E-C) coupling, were investigated. Production of reactive oxygen species (ROS) in the ventricle was determined using the intracellular fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). Effects of the specific mitoK_{ATP} channel opener diazoxide (Diaz, 50 μM) or the blocker 5-hydroxydecanoate (5-HD, 500 μM), the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 50 μM), the antioxidant N-(2-mercapto-propionyl)glycine (MPG, 1 mM), and the PKC inhibitor chelerythrine (Chel, 5 μM) on oxidative stress and postanoxic functional recovery were determined. Under normoxia, the baseline parameters were not altered by any of these pharmacological agents, alone or in combination. During the first 20 min of postanoxic reoxygenation, Diaz doubled the peak of ROS production and, interestingly, accelerated recovery of ventricular EMD and the PR interval. Diaz-induced ROS production was suppressed by 5-HD, MPG, or L-NAME, but not by Chel. Protection of ventricular EMD by Diaz was abolished by 5-HD, MPG, L-NAME, or Chel, whereas protection of the PR interval was abolished by L-NAME exclusively. Thus pharmacological opening of the mitoK_{ATP} channel selectively improves postanoxic recovery of cell-to-cell communication and ventricular E-C coupling. Although the NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways also seem to be involved in this cardioprotection, their interrelation in the developing heart can differ markedly from that in the adult myocardium.

diazoxide; mitochondria; chick; hypoxia-reoxygenation; atrioventricular coupling

IT IS GENERALLY ACCEPTED that activation of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ (mitoK_{ATP}) channels can protect (8, 26) the heart against ischemia-reperfusion injury (1) and mimic ischemic preconditioning (22). Indeed, mitoK_{ATP} channel opening improves the recovery of contractility (7, 40) and reduces infarct size (10, 27) in the reperfused heart. In adult (3, 7, 25, 31), neonatal (14), or embryonic (19, 47) isolated cardiomyocytes, pretreatment with a mitoK_{ATP} channel opener appears to increase reactive oxygen species (ROS) production before

ischemia and reduce postischemic injury. Furthermore, the protection afforded by mitoK_{ATP} channel openers against the reperfusion-induced cell death (apoptotic or necrotic) appears to necessitate stimulation of PKC activity by ROS (24) and activation of nitric oxide (NO)-dependent pathways (19, 33).

Despite recent advances in understanding of these mechanisms, little is known about the role that mitoK_{ATP} channel modulation could play in ROS production and functional recovery of the hypoxic-reoxygenated developing heart. Although the embryonic/fetal heart normally grows and functions in a relatively hypoxic environment, it rapidly reacts to oxygen deprivation and reoxygenation, e.g., as in the case of transient uteroplacental ischemia. We previously characterized the chrono-, dromo-, and inotropic responses of the isolated embryonic chick heart (4–5 days old) to anoxia-reoxygenation (30, 34). We also found that this preparation is subjected to an oxidative stress during reoxygenation (28) similar to reperfused cardiac cells obtained from 10-day-old chick embryo (41, 45). Interestingly, the postischemic protection of embryonic ventricular myocytes afforded by mitoK_{ATP} channel opening involves ROS and/or NO production (6, 19). On the other hand, we recently found that inducible NO synthase (NOS) is strongly expressed in the embryonic myocardium and generates NO during anoxia-reoxygenation (38), improving recovery of excitation-contraction (E-C) coupling in the ventricle (21). However, the underlying protective mechanism involving the mitoK_{ATP} channel remains to be explored in the whole developing heart.

In the present study, we asked whether pharmacological opening of the mitoK_{ATP} channel improves postanoxic recovery of pacemaking activity, cell-to-cell communication, myocardial contractility, and E-C coupling. Using a pharmacological approach, we also investigated the signaling pathways operating in the embryonic myocardium, with special emphasis on ROS-, NO-, and PKC-dependent pathways.

MATERIALS AND METHODS

This investigation fully conforms with the “Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings” of the American Physiological Society.

Reagents

The fluorescence probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), the mitochondrial complex III inhibitor myxothiazol (Myxo), the radical scavenger N-(2-mercapto-propionyl)glycine (MPG), the NOS inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), the mi-

Address for reprint requests and other correspondence: E. Raddatz, Dept. of Physiology, Faculty of Biology and Medicine, 7 rue du Bugnon, 1005 Lausanne, Switzerland (E-mail: eric.raddatz@unil.ch).

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.

to K_{ATP} channel opener diazoxide (Diazo), the mito K_{ATP} blocker 5-hydroxydecanoate (5-HD), and the nonselective K_{ATP} channel blocker glibenclamide (Glib) were purchased from Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland). The PKC inhibitor chelerythrine (Chel) was purchased from Calbiochem (JURO Supply, Lucerne, Switzerland).

In Vitro Mounting of the Heart

Fertilized eggs from Lohman Brown hens were incubated for 96 h at 38°C and 95% relative humidity to reach embryonic stage 24HH [according to Hamburger and Hamilton (13)]. The intact and spontaneously beating heart was carefully excised and placed in the culture compartment of an airtight chamber. The chamber was equipped with two windows for observation and measurements and maintained under controlled metabolic conditions on the thermostabilized stage (37°C) of an inverted microscope (model IMT2, Olympus, Tokyo, Japan) as previously described in detail (30, 38). Briefly, the culture compartment (300 μ l) was separated from the gas compartment by a thin (15 μ m) transparent and gas-permeable silicone membrane (RTV 141, Rhône-Poulenc, Lyon, France). The heart was slightly flattened by the silicone membrane, and the resulting thickness of the myocardial tissue facing the gas compartment was \sim 300 μ m. Thus P_{O_2} at the tissue level could be strictly controlled and rapidly modified (within <5 s) by flushing high-grade gas of selected composition through the gas compartment. At this developmental stage, the heart lacks vascularization and the myocardial oxygen requirement is met exclusively by diffusion.

The standard HCO_3^-/CO_2 -buffered medium was composed of (in mmol/l) 99.25 NaCl, 0.3 NaH_2PO_4 , 10 $NaHCO_3$, 4 KCl, 0.79 $MgCl_2$, 0.75 $CaCl_2$, and 8 *D*-glucose. This culture medium was equilibrated in the chamber with 2.31% CO_2 in air (normoxia and reoxygenation) or in N_2 (anoxia), yielding pH 7.4.

MPG (1 mM), 5-HD (500 μ M), L-NAME (50 μ M), and Myxo (10 μ M) were directly dissolved in this medium (control). Diazo (50 μ M), Glib (1 μ M), and Chel (5 μ M) were first dissolved in DMSO (vehicle) and then diluted in the medium. The final DMSO concentration was 0.5%.

Measurement of Oxidant Stress

ROS generation was assessed using the nonfluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH). The membrane-permeable diacetate form of DCFH (DCFH-DA) was dissolved in methanol at 40 mM (stock aliquots) and kept at $-20^\circ C$. Before experimentation, the stock solution was diluted in culture medium to give a final concentration of 10 μ M. Within the cell, esterases cleave the acetate groups of DCFH-DA, thus trapping DCFH intracellularly (23). DCFH is known to be preferentially oxidized by H_2O_2 or hydroxyl radical (OH^\bullet) but poorly by superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) (12), yielding the fluorescent oxidized probe 2',7'-dichlorofluorescein (DCF).

Isolated hearts were loaded with DCFH-DA for \sim 30 min at room temperature in the dark. Then the hearts were mounted in the culture chamber, and the medium was renewed with fresh DCFH-DA solution. The chamber was placed on the thermostabilized stage (37°C) of an epifluorescence microscope (Leitz) 15 min before the first fluorescence measurement. The fluorescence, expressed in arbitrary units, was measured on a restricted ventricular area (300 μ m diameter) every 30 s throughout anoxia-reoxygenation with use of an excitation wavelength of 490 nm and an emission wavelength of 533 ± 3 nm. To avoid photobleaching of the fluorescent dye, illumination time was limited to 6 ms. The slope of the fluorescent signal vs. time represented the rate of production of oxyradicals and was expressed as arbitrary units per second.

To take into consideration interindividual variations in size and slight developmental differences of the hearts, end-diastolic wall area of the ventricle (mm^2) was obtained from frames of video recordings of contracting heart obtained at the end of each experiment, as

previously described (29). Moreover, the density of protein of the ventricular wall was obtained by dividing the protein content by the area and expressed as micrograms of protein per square millimeter.

Recording of Electrical and Mechanical Contractions

Electrical and contractile activities were recorded simultaneously and continuously throughout in vitro experiments as previously described (30, 34).

Electrical activity. ECG activity of the spontaneously contracting hearts was recorded using two Ag/AgCl electrodes 1 mm apart (0.3 mm diameter) inserted into the window facing the culture compartment. Briefly, the atrial and ventricular regions were placed in the immediate vicinity of these electrodes, which were connected to a differential preamplifier (gain = 2,000), resulting in an output signal of ~ 1 V from peak to peak. This signal was digitized and processed using an Apple Macintosh computer. The ECG displayed characteristic P, QRS, and T components, which allowed assessment of beating rate (beats/min) and atrioventricular (AV) conduction delay (PR interval). Additionally, the various types of arrhythmias (mainly sinoatrial arrest; brady- and tachycardia; 1st-, 2nd-, and 3rd-degree AV block; and Wenckebach phenomenon) and their duration could be precisely determined.

Contractile activity. Two adjustable phototransistors were positioned over the projected image of the sinoatrial pacemaking region and the apex of the ventricle, allowing detection of edge motion of the myocardial wall. The actual distance between investigated atrial and ventricular regions was the same in all groups: 2.3 ± 0.2 mm ($n = 56$). The mean propagation velocity of the wave of contraction was obtained by dividing this distance by the time between the peaks of the maximal shortening velocity in atrium and ventricle (i.e., mechanical AV delay).

The actual ventricular shortening at the apex (S , μ m) was determined using video recordings obtained before anoxia and at the end of reoxygenation. The maximal shortening and relaxation velocities were obtained from the maximal positive and negative values of the first derivative of S (dS/dt , mm/s), respectively.

E-C coupling. The electromechanical delay (EMD, ms), reflecting the efficiency of E-C coupling, was determined at the level of the atrium (EMD_a) and ventricle (EMD_v) by measuring the delay between the electrical and mechanical events, i.e., the interval of time between the very initial phase of the P and QRS components and the initiation of contraction in the atrium and ventricle, respectively.

Anoxia-Reoxygenation Protocol

After 45 min of in vitro stabilization under normoxia at 37°C, the hearts were subjected to 30 min of strict anoxia followed by 60 min of reoxygenation. The pharmacological agents were present throughout anoxia-reoxygenation.

Protein and Glycogen Determination

At the end of each experiment, the hearts were carefully dissected into atria, ventricle, and conotruncus and stored at $-20^\circ C$ for subsequent determination of protein and glycogen content, as described previously (20).

Statistical Analysis

Values are means \pm SD, unless otherwise indicated. The significance of any difference between the groups was assessed using Student's *t*-test or analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test. The differences between the rates of functional recovery in the experimental groups were assessed by repeated-measures ANOVA during the first 20 min of reoxygenation. To take into consideration preanoxic variations between groups, all parameters are

expressed as percent changes of their preanoxic value. Statistical significance was defined by $P < 0.05$.

RESULTS

Functional Parameters Under Normoxia

Only spontaneously and regularly contracting hearts were used in this study. The preanoxic baseline parameters were not significantly altered by any of the agents used, either alone or in combination (Table 1).

Oxidant Stress in the Anoxic-Reoxygenated Embryonic Heart

Figure 1 shows that the time course of DCF fluorescence intensity measured in the ventricle essentially depended on the presence of oxygen. Preanoxic ROS production was not affected by any of the agents, alone or in combination (Fig. 2). On reoxygenation, the rate of ROS production was maximal after 10 ± 3 min in the control group ($n = 6$) and was reduced by 73 and 60% in the presence of Myxo and MPG, respectively ($P < 0.02$; Fig. 2).

Effects of K_{ATP} Channel Modulation on ROS Production During Reoxygenation

Opening of the mitoK_{ATP} channel by Diazo doubled ROS production with respect to vehicle ($P < 0.005$). This Diazo-induced ROS production was abolished by 5-HD, MPG, or L-NAME but not by Chel. However, 5-HD, L-NAME, or Chel alone had no effect on ROS production (Fig. 2).

Recovery of AV Conduction and E-C Coupling Was Improved by Activation of the mitoK_{ATP} Channel

Although all parameters fully recovered at the end of reoxygenation, opening of the mitoK_{ATP} channel with Diazo significantly improved the rate of recovery of the PR interval and EMD_v during the first 20 min of reoxygenation (Fig. 3). On the contrary, recovery of the other functional parameters was not affected by Diazo. 5-HD abolished the Diazo-induced protection of EMD_v but not that of the PR interval. However, 5-HD alone did not have an effect on the rate of recovery of the functional parameters compared with the control group (Fig. 4). The nonselective K_{ATP} channel blocker Glib systematically induced atrial tachycardia during normoxia and reoxygenation associated with frequent second-degree AV blocks (not

shown). The mechanical AV delay was 142 ± 22 ms ($n = 56$) under preanoxia and 227 ± 48 ms ($n = 25$) at the onset of reoxygenation and displayed the same time course as the electrical AV delay (PR interval), without regard to treatment. Furthermore, the mean propagation velocity of the wave of contraction between the atrium and ventricle passed from 16.6 ± 3.1 mm/s ($n = 56$) under preanoxia to 10.8 ± 2.5 mm/s ($n = 25$; $P < 0.0001$) at the onset of reoxygenation.

Protection of E-C Coupling Was Abolished by ROS Scavenger or PKC Inhibitor

During reoxygenation, treatment with MPG alone decreased ROS production (Fig. 2) and increased EMD_v (Fig. 4) but had no effect on other functional parameters. The Diazo-induced burst of ROS observed during reoxygenation was significantly lower in the Diazo + MPG group than in the Diazo group and comparable with that of vehicle group (Fig. 2). Moreover, scavenging ROS by MPG abolished the protective effect of Diazo on EMD_v (Fig. 3). By contrast, heart rate, PR interval, EMD_a, and ventricular shortening were not altered by the addition of MPG (Fig. 3).

During reoxygenation, Chel did not alter Diazo-induced ROS production (Fig. 2) but abolished the improvement in EMD_v by the mitoK_{ATP} channel opener (Fig. 5). Furthermore, the Wenckebach phenomenon was observed during 52 ± 14 min in the Diazo + Chel group ($n = 5$) and during 19 ± 11 ($n = 7$), 19 ± 9 ($n = 7$), and 20 ± 4 min ($n = 4$) in the Diazo, vehicle, and Chel groups, respectively ($P < 0.01$, Diazo + Chel vs. others). Chel alone did not affect ROS production or functional parameters under steady normoxia or during reoxygenation (Figs. 2 and 5).

Differences in sensitivity to anoxia-reoxygenation between the atrium and ventricle are illustrated by systematically longer EMD_a than EMD_v under baseline conditions (Table 1) and no significant effect of reoxygenation on EMD_a (Figs. 3–6).

Endogenously Produced NO Was Necessary for Diazo-Induced Protection

L-NAME alone did not affect ROS production throughout anoxia-reoxygenation (Fig. 2) but significantly delayed recovery of EMD_v during reoxygenation (Fig. 4). Furthermore, L-NAME abolished the Diazo-induced ROS production (Fig.

Table 1. Baseline functional parameters were not altered by any of the treatments

	Control (n = 6)	5-HD (n = 5)	L-NAME (n = 4)	MPG (n = 4)	Vehicle (n = 7)	Diazo (n = 7)	Diazo + 5-HD (n = 5)	Diazo + MPG (n = 4)	Diazo + Chel (n = 5)	Diazo + L-NAME (n = 5)	Chel (n = 4)
Heart rate, beats/min	151±24	160±8	162±12	132±5	168±12	177±34	160±6	143±18	144±7	161±13	164±13
PR interval, ms	133±25	134±28	145±20	129±19	122±6	118±15	129±15	132±15	142±10	125±25	134±26
Mechanical AV delay, ms	143±26	141±28	159±19	140±13	130±13	126±14	136±19	139±19	158±7	139±28	146±25
EMD _a , ms	16±4	14±3	18±3	16±3	13±2	13±4	15±4	15±5	14±2	21±7	15±0
EMD _v , ms	10±3	7±3	13±3	10±4	10±2	12±5	11±1	10±7	12±6	12±3	13±4
Ventricular shortening, μm	22±21	27±16	7±3	13±7	28±21	28±22	29±27	8±4	7±4	17±12	8±5
Ventricular shortening velocity, mm/s	1.5±1.3	1.4±0.6	0.6±0.3	0.9±0.4	2.1±1.6	2.0±1.5	2.0±1.9	0.6±0.2	0.5±0.2	0.3±0.2	0.6±0.3

Values are means ± SD; n, number of hearts. AV, atrioventricular; EMD_a and EMD_v, atrial and ventricular electromechanical delay, respectively; 5-HD, 5-hydroxydecanoate; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; MPG, N-(2-mercaptopropionyl)glycine; Diazo, diazoxide; Chel, chelerythrin. There was no significant difference between groups (ANOVA with Tukey's test).

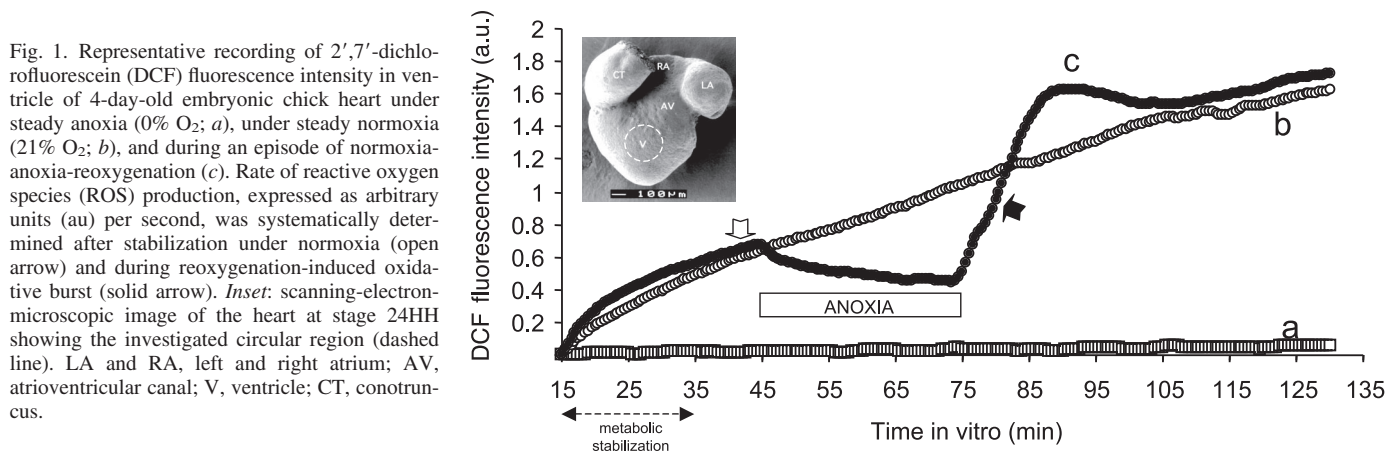


Fig. 1. Representative recording of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence intensity in ventricle of 4-day-old embryonic chick heart under steady anoxia (0% O_2 ; a), under steady normoxia (21% O_2 ; b), and during an episode of normoxia-anoxia-reoxygenation (c). Rate of reactive oxygen species (ROS) production, expressed as arbitrary units (au) per second, was systematically determined after stabilization under normoxia (open arrow) and during reoxygenation-induced oxidative burst (solid arrow). Inset: scanning-electron-microscopic image of the heart at stage 24HH showing the investigated circular region (dashed line). LA and RA, left and right atrium; AV, atrioventricular canal; V, ventricle; CT, conotruncus.

2) and protection of AV conduction and EMD_v during reoxygenation (Fig. 6). Contractile recovery was improved by L-NAME, alone and in combination with Diazo (Figs. 4 and 6).

Metabolic and Morphometric Parameters

The protein content of the whole heart, atria, ventricle, and conotruncus was 69.7 ± 14.3 , 15.5 ± 5.4 , 42.7 ± 9.1 , and $11.1 \pm 3.7 \mu\text{g}$ ($n = 109$), respectively, and did not vary from one group to another. Glycogen content was 1.2 ± 0.6 , 0.7 ± 0.3 , and $0.5 \pm 0.3 \text{ nmol glucose unit}/\mu\text{g protein}$ ($n = 109$) in atrium, ventricle, and conotruncus, respectively. In hearts on which fluorescence was measured, protein content, area, and density of protein of the ventricular wall were $44.7 \pm 7.7 \mu\text{g}$, $3.8 \pm 0.8 \text{ mm}^2$, and $11.9 \pm 2.9 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($n = 45$), respectively, with no statistically significant differences between the groups.

DISCUSSION

Taken together, our main findings indicate that 1) $\text{mito}K_{ATP}$ channel opening by Diazo increases ROS production at reoxygenation exclusively, 2) ROS production is necessary to improve recovery of E-C coupling in the ventricle, 3) this beneficial effect is mediated by PKC, and 4) the Diazo-induced protection requires NOS activation.

Limitations of the Experimental Model

Detection of oxidant stress by DCFH fluorescence. Under our experimental conditions, the fluorescence measured in the ventricle was not influenced by the size of the hearts, because the protein density of the ventricular wall did not vary from one group to another. The decrease in fluorescence intensity observed during anoxia might be attributed to the unavoidable diffusion of the accumulated oxidized form of DCFH out of the cell (15). The complex kinetics underlying this backdiffusion are technically difficult to determine, and the changes in DCFH fluorescence intensity vs. time (arbitrary units/s) might be slightly underestimated in all experiments to the same extent. The fact that the rate of DCFH oxidation in the absence of oxygen was negligible showed that only oxygen-derived radicals were able to alter fluorescence and that there was no illumination-induced DCFH autooxidation under our experimental conditions (Fig. 1).

Although the vehicle DMSO used in this study is also known as a cell-penetrating $\text{OH}\cdot$ scavenger, it affected neither ROS

production nor the time course of functional parameters with respect to the vehicle-free control condition.

Contractile activity. In contrast to the chronotropic and dromotropic parameters, the ventricular shortening and maxi-

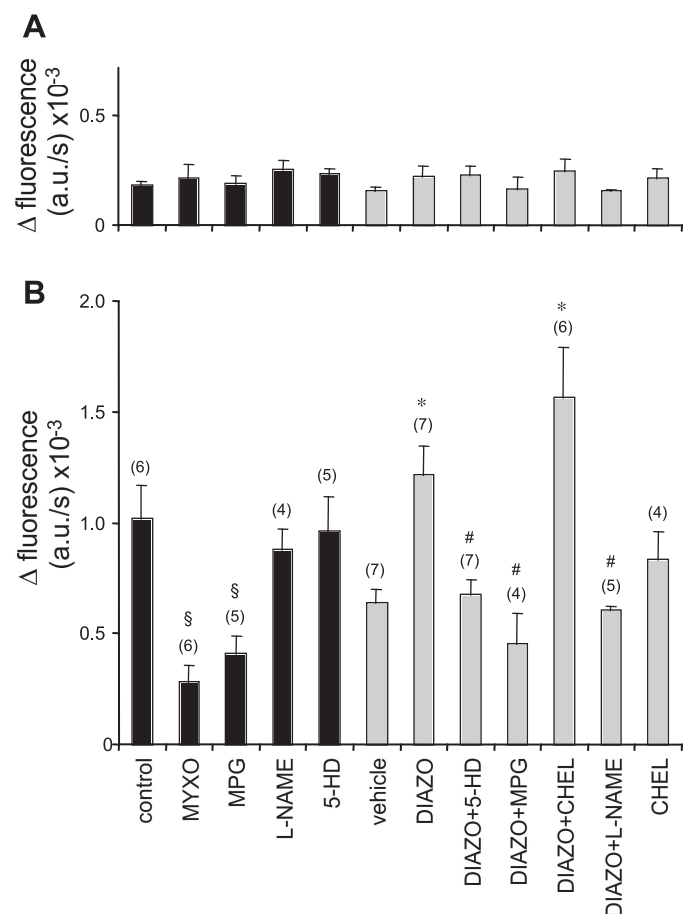


Fig. 2. Rate of ROS production determined using DCF fluorescence at the level of the ventricle under steady preanoxia (A) and during reoxygenation (B) after 30 min of anoxia in control hearts and hearts treated with myxothiazol (Myxo), *N*-(2-mercaptopropionyl)glycine (MPG), *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 5-hydroxydecanoate (5-HD), diazoxide (Diazo), and chelerythrine (Chel), alone or in combination, no vehicle (control); shaded bars, DMSO (vehicle). Values are means \pm SE of number of hearts in parentheses. Statistical significance is as follows: § $P < 0.02$ vs. control; * $P < 0.003$ vs. vehicle; # $P < 0.01$ vs. Diazo (Student's *t*-test).

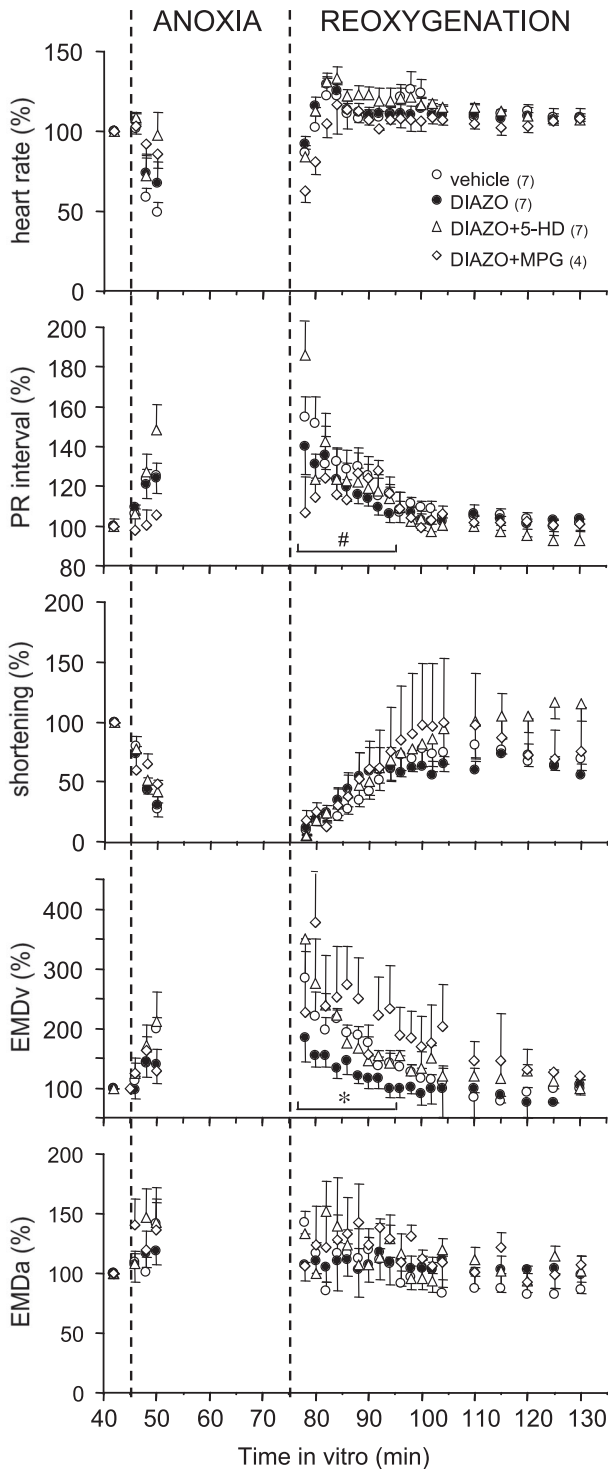


Fig. 3. Functional parameters during anoxia-reoxygenation as percent changes of their preanoxic values. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ (mito K_{ATP}) channel opener Diazo did not affect recovery of heart rate, ventricular shortening, or atrial electromechanical delay (EMD_a) but improved recovery of AV conduction (PR interval) and ventricular electromechanical delay (EMD_v). Protection of EMD_v was abolished by the mito K_{ATP} channel blocker 5-HD (Diazo + 5-HD) or by the antioxidant MPG (Diazo + MPG). Values are means \pm SE of number of hearts in parentheses. #*P* < 0.05, Diazo vs. vehicle; **P* < 0.05, Diazo vs. vehicle, Diazo + 5-HD, or Diazo + MPG (repeated-measures ANOVA during the first 20 min of reoxygenation).

mal shortening velocity displayed important interindividual variations, even after in vitro stabilization (Table 1). Such variability of contractile activity might be due to slight differences in the developmental stage, variations of cardiac three-

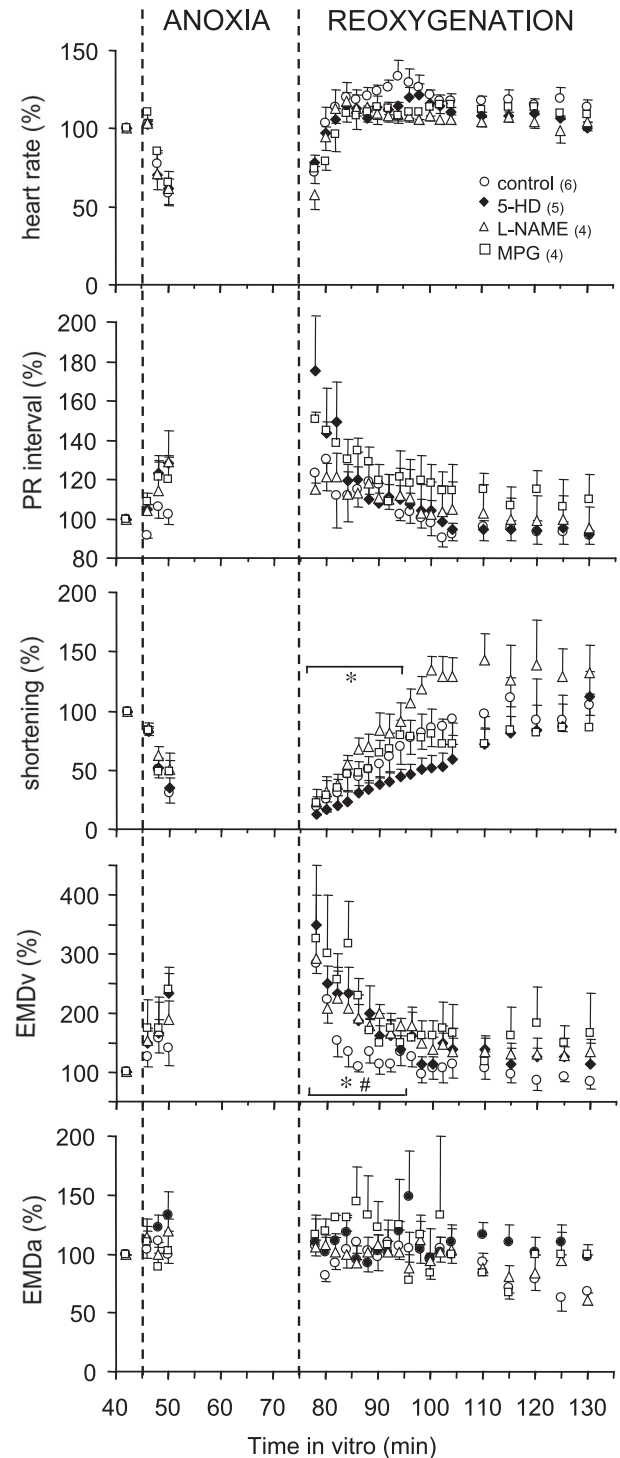


Fig. 4. During reoxygenation, 5-HD or MPG alone did not have an effect on functional parameters, whereas L-NAME alone delayed EMD_v recovery and improved shortening. Values (means \pm SE of number of hearts in parentheses) are expressed as percentage of preanoxic values. **P* < 0.05, L-NAME vs. control; #*P* < 0.05, MPG vs. control (repeated-measures ANOVA during the first 20 min of reoxygenation).

dimensional structure, and/or degree of flattening of the hearts in the culture compartment, as discussed previously (29, 30). Shortening determined just before anoxia ($19 \pm 17 \mu\text{m}$, $n = 56$) and at the end of reoxygenation ($20 \pm 16 \mu\text{m}$, $n = 56$), as

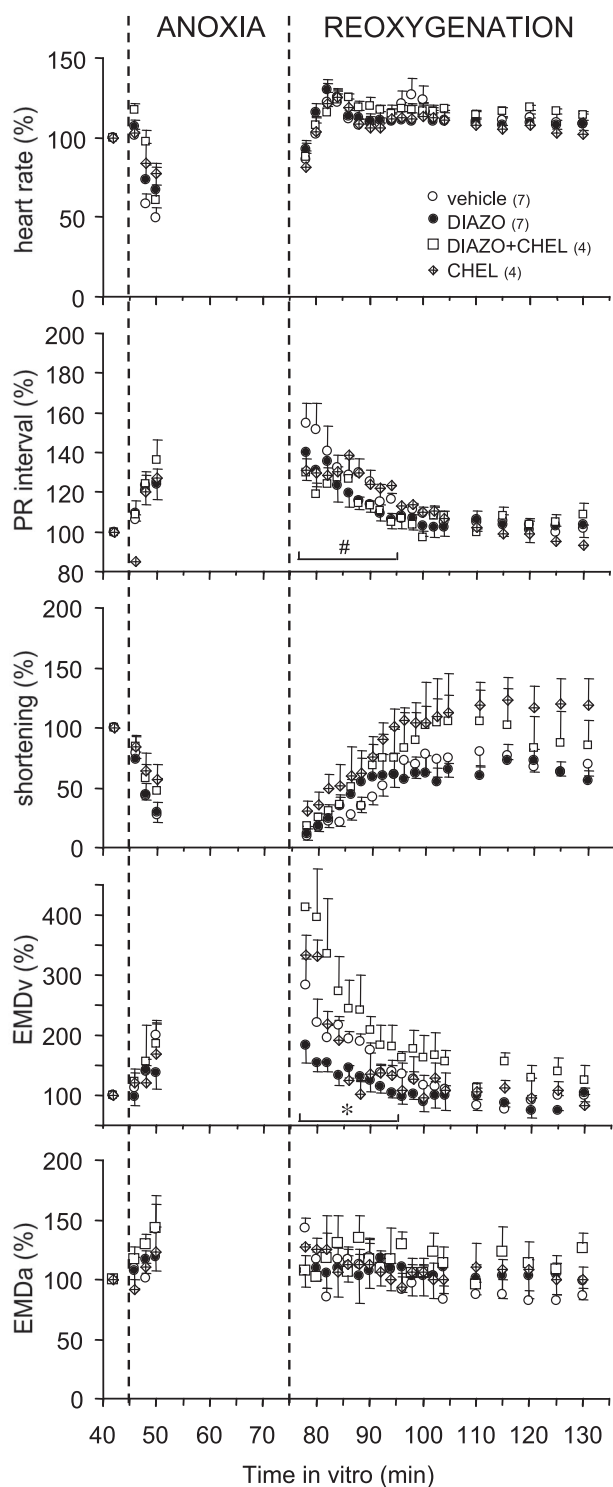


Fig. 5. Chel abolished Diazo-induced protection of EMD_v without affecting other functional parameters. Values (means \pm SE of number of hearts in parentheses) are expressed as percentage of preanoxic values. * $P < 0.05$, Diazo vs. vehicle; * $P < 0.05$, Diazo vs. vehicle or Diazo + Chel (repeated-measures ANOVA during the first 20 min of reoxygenation).

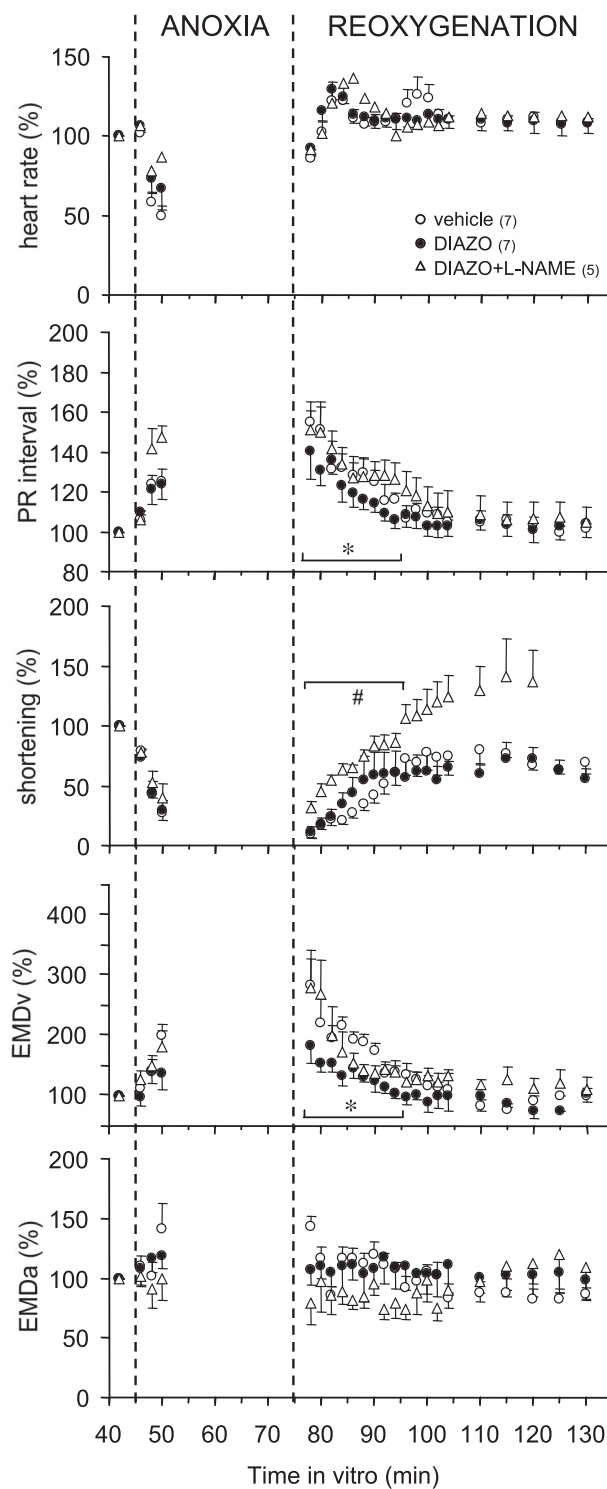


Fig. 6. L-NAME abolished Diazo-induced protection of PR interval and EMD_v and improved shortening recovery during reoxygenation. Values (means \pm SE of number of hearts in parentheses) are expressed as percentage of preanoxic values. * $P < 0.05$, Diazo vs. vehicle or Diazo + L-NAME; # $P < 0.001$, Diazo + L-NAME vs. vehicle (repeated-measures ANOVA during the first 20 min of reoxygenation).

well as the rate of contractile recovery, was similar in all experimental groups, indicating that contractile activity fully recovered. Furthermore, inotropy and lusitropy were altered to the same extent, because the ratio of the maximal contraction

velocity to the maximal relaxation velocity was stable throughout anoxia-reoxygenation: 1.25 ± 0.25 ($n = 56$).

Opening of the mitoK_{ATP} Channel Increases ROS Production and Improves Functional Recovery

The maximal rate of ROS production was four times higher during reoxygenation than during preanoxia, indicating that the embryonic heart is subjected to an important postanoxic oxidative stress. This is corroborated by the 60–70% reduction in ROS production by MPG or Myxo, indicating also that mitochondrial complex III was the main source of ROS during reoxygenation.

It has been shown that treatment of adult human and mammalian cardiomyocytes with the mitoK_{ATP} channel opener Diazo before, but not during, ischemia-reperfusion increased ROS production and mimicked ischemic preconditioning (3, 7, 25, 31). However, in our experimental model, Diazo was present before and during anoxia-reoxygenation and increased ROS production during the early phase of reoxygenation, but not during normoxia. These differences between the adult and developing heart may be partly attributed to the degree of mitochondrial differentiation (35, 43) illustrated by a low oxidative metabolism (29) and to a limited antioxidant capacity at the stage investigated. Moreover, the fact that 5-HD alone affected neither ROS production nor functional recovery suggests that the mitoK_{ATP} channel remains closed throughout anoxia-reoxygenation in the control hearts. Interestingly, the Diazo-induced additional ROS production was associated with an improved recovery of ventricular E-C coupling during reoxygenation. The facts that Diazo is 1,000-fold more potent to activate mitoK_{ATP} than sarcolemmal K_{ATP} channels (9) and that the nonselective K_{ATP} channel blocker Glib, but not 5-HD, induced major atrial arrhythmias associated with second-degree AV blocks clearly indicate that the mitoK_{ATP} channels are directly involved in Diazo-induced protection of E-C coupling, whereas sarcolemmal K_{ATP} channels play no significant role. The obvious proarrhythmic effect of Glib observed in this work suggests, however, that the sarcolemmal K_{ATP} channels might play a crucial role in controlling the membrane potential, especially in the immature sinoatrial pacemaker cells.

The fact that MPG abolished Diazo-induced ROS production and E-C coupling protection during reoxygenation clearly indicates that ROS are also directly involved in the protective effect of Diazo in the embryonic heart. These results are in agreement with recent reports on pharmacological preconditioning using mitoK_{ATP} opener in adult mammalian (7, 27), adult human (3), and embryonic chick (19) cardiomyocytes. Thus the postanoxic protection of E-C coupling afforded by mitoK_{ATP} channel opening seems to be mediated by an additional ROS production, independent of the investigated species, the experimental models, or the selected protocol.

PKC Protects Selectively Ventricular E-C Coupling

During reoxygenation, Chel abolished the Diazo-induced protection of EMD_v, suggesting that E-C coupling is modulated by PKC, which can be indirectly activated by mitoK_{ATP} channel opening via ROS production (Fig. 7). The E-C coupling machinery (mainly the plasmalemmal L-type Ca²⁺ channel, the ryanodine receptor channel, SERCA2, and phospholamban) is present and starts to be functional in the 4-day-old

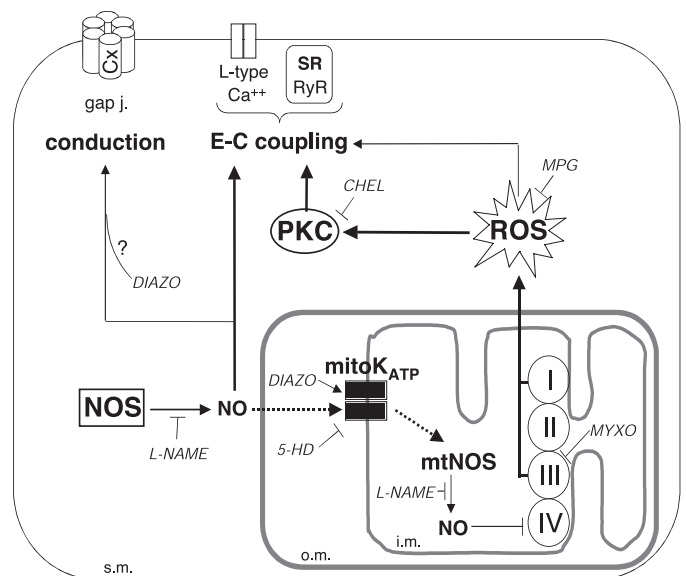


Fig. 7. Schematic representation based on the present findings and illustrating interrelations between mitoK_{ATP} channel, cytosolic and mitochondrial nitric oxide synthases (NOS and mtNOS, respectively), diazoxide-induced mitochondria-derived reactive oxygen species (ROS), and PKC during postanoxic reoxygenation of the embryonic heart. For the sake of clarity, only the major effects of NO, ROS, and PKC on recovery of cell-to-cell conduction through gap junctions (gap j) and ventricular excitation-contraction (E-C) coupling during reoxygenation are indicated. Arrow, activation; T-shaped symbol, inhibition. Pharmacological agents are indicated in italics. Cx, connexins; L-type Ca²⁺, L-type Ca²⁺ channel; RyR, ryanodine receptor channel; SR, sarcoplasmic reticulum; I–IV, respiratory chain complexes; sm, sarcolemmal membrane; im and om, inner and outer mitochondrial membranes, respectively.

embryonic chick heart (37). It has previously been found that Ca²⁺ entry through a sarcolemmal L-type Ca²⁺ channel predominantly contributes to the Ca²⁺ transient during the cardiac cycle and strongly contributes to E-C coupling (39) but also participates in reoxygenation-induced Ca²⁺ overload and myocardial dysfunction at stage 24HH (37). These observations further strengthen the important role that L-type Ca²⁺ channel modulation by PKC may play in postanoxic recovery of the developing heart. Indeed, although controversial (17), PKC activity has been reported to restore Ca²⁺ homeostasis and play an important role in regulation of E-C coupling during postischemic reperfusion, whereas Chel, at the concentration used in the present study, significantly enhances postischemic Ca²⁺ overload in the adult heart (36). On the basis of our findings, we propose that such mechanisms operate also in the anoxic-reoxygenated embryonic heart. However, the role of different PKC isoforms, as well as their target proteins, deserves further investigation.

Moreover, the fact that Chel did not affect Diazo-induced ROS production but abolished the protection of EMD_v afforded by Diazo during reoxygenation suggests that PKC activation is downstream of Diazo-induced ROS in the embryonic heart (Fig. 7).

Endogenous NO Plays an Important Role in Diazo-Induced ROS Production and Cardioprotection

Recently, it has been shown that exogenous NO can activate the mitoK_{ATP} channel (33) and that NO and ROS are necessary

to increase cell survival of 10-day-old chick cardiomyocytes via opening of mito K_{ATP} channels (19). We recently showed that the embryonic heart produces NO during anoxia-reoxygenation mainly derived from inducible NOS, which is known to be strongly expressed early during cardiogenesis (38). The present data show that L-NAME alone delays recovery of EMD_v , as in our previous work (21). These findings are in agreement with studies showing that NO can increase the open probability of the ryanodine receptor channel (46), which could accelerate Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum and, thus, shorten EMD_v during reoxygenation (Fig. 7). The fact that NOS inhibition had no effect on the DCF signal during anoxia-reoxygenation indicates that production of ONOO⁻ resulting from a possible reaction between NO and O_2 is negligible in the embryonic heart under control conditions. Indeed, the DCFH technique is known to be sensitive not only to H_2O_2 and OH[•] but also to ONOO⁻ (15). Moreover, myocardial levels of nitration of protein tyrosine by ONOO⁻ (nitrotyrosine assessed by immunoblotting assay) were not increased after anoxia-reoxygenation (Raddatz and Markert, unpublished data).

Because L-NAME abolished Diazo-mediated ROS production and functional protection, activation of NOS appears to be a prerequisite for the beneficial effects of mito K_{ATP} channel opening in the setting of anoxia-reoxygenation. It seems that cardiac mitochondria contain an NOS isoform (mtNOS) (18, 48) and that NO inhibits mitochondrial respiration at the complex IV level (2) and increases H_2O_2 production (32). On the basis of these observations and our findings, we hypothesize that endogenously produced NO could act directly on proteins involved in E-C coupling when mito K_{ATP} channels are closed, as under control conditions. On the other hand, opening of the mito K_{ATP} channel by Diazo could activate mtNOS and increase intramitochondrial NO production, resulting in increased ROS production at the level of complex III and I. This additional ROS production could activate PKC and result in phosphorylation of the L-type Ca^{2+} channel and/or ryanodine receptor channel, improving functional recovery (Fig. 7).

Our data showing that the PR interval was significantly prolonged and that the incidence of AV blocks was specially high during anoxia and reoxygenation clearly indicate that cell-to-cell communication was strongly altered. Indeed, although there is no specialized conduction system, various connexins (e.g., Cx43) are expressed and functional during early cardiogenesis, and their relative abundance (44), electrophysiological characteristics (4, 42), and regulation (5) vary throughout development. The fact that Diazo-induced protection of the PR interval was not suppressed by any of the agents, except L-NAME, suggests that NO, associated with Diazo, is necessary to protect cell-to-cell communication during anoxia-reoxygenation. Indeed, it has been shown that electrical uncoupling of cardiomyocytes during ischemia can be accelerated by K_{ATP} channel inhibition (16) and that L-NAME can decrease Cx43 phosphorylation and expression in vascular muscle (11), modulating cell-to-cell communication. However, information about a possible interaction of NO and Diazo with connexins is not available in the literature, and the exact mechanisms underlying this protection remain to be explored.

In conclusion, to the best of our knowledge, this study is the first to explore reoxygenation-induced alterations of electro-

mechanical coupling in relation to pharmacological modulation of mito K_{ATP} channels in the developing heart. Our results show that activation of the mito K_{ATP} channel by Diazo throughout anoxia-reoxygenation improves recovery of AV conduction and ventricular E-C coupling without significantly affecting other parameters. Furthermore, protection of E-C coupling by mito K_{ATP} channel opening requires NOS activation, ROS signaling, and PKC-sensitive pathways.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Christian Haerberli, Michel Jadé, and André Singy for technical assistance with the ECG recording system and electronic hardware. The collaboration of Hélène Gabioud is gratefully acknowledged. We also thank Anne-Catherine Thomas for skillful technical assistance.

REFERENCES

1. Bolli R and Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 79: 609–634, 1999.
2. Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1411: 351–369, 1999.
3. Carroll R, Gant VA, and Yellon DM. Mitochondrial K_{ATP} channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc Res* 51: 691–700, 2001.
4. Chen YH and DeHaan RL. Asymmetric voltage dependence of embryonic cardiac gap junction channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 270: C276–C285, 1996.
5. Duncan JC and Fletcher WH. α_1 -Connexin (connexin43) gap junctions and activities of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in developing mouse heart. *Dev Dyn* 223: 96–107, 2002.
6. Ferdinandy P and Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 138: 532–543, 2003.
7. Forbes RA, Steenbergen C, and Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88: 802–809, 2001.
8. Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, and Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1606: 1–21, 2003.
9. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, and Schindler PA. The mitochondrial K_{ATP} channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271: 8796–8799, 1996.
10. Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Grover GJ, and Gross GJ. K_{ATP} opener-induced delayed cardioprotection: involvement of sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP} channels, free radicals and MEK1/2. *J Mol Cell Cardiol* 35: 985–992, 2003.
11. Haefliger JA and Meda P. Chronic hypertension alters the expression of Cx43 in cardiovascular muscle cells. *Braz J Med Biol Res* 33: 431–438, 2000.
12. Halliwell B and Gutteridge JMC. Detection of hydrogen peroxide. In: *Free Radicals in Biology and Medicine* (3rd ed.). New York: Oxford University Press, 1998, p. 380–388.
13. Hamburger V and Hamilton H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88: 49–92, 1951.
14. Ichinose M, Yonemochi H, Sato T, and Saikawa T. Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2235–H2241, 2003.
15. Ischiropoulos H, Gow A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, and Crow JP. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol* 301: 367–373, 1999.
16. Jain SK, Schuessler RB, and Saffitz JE. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. *Circ Res* 92: 1138–1144, 2003.
17. Kamp TJ and Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* 87: 1095–1102, 2000.
18. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, and Peterson J. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14126–14131, 2001.
19. Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, and Vanden Hoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relation-

- ship to mitochondrial K_{ATP} channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H299–H308, 2003.
20. **Lyon X, Kappenberger L, Sedmera D, Rochat AC, Kucera P, and Raddatz E.** Pacing redistributes glycogen within the developing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33: 513–520, 2001.
 21. **Maurly JP, Sarre A, Terrand J, Rosa A, Kucera P, Kappenberger L, and Raddatz E.** Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide. *Mol Cell Biochem* 265: 141–149, 2004.
 22. **Murphy E.** Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res* 94: 7–16, 2004.
 23. **Murrant CL and Reid MB.** Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55: 236–248, 2001.
 24. **Murriel CL and Mochly-Rosen D.** Opposing roles of δ - and ϵ -PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Arch Biochem Biophys* 420: 246–254, 2003.
 25. **Oldenburg O, Yang XM, Krieg T, Garlid KD, Cohen MV, Grover GJ, and Downey JM.** P1075 opens mitochondrial K_{ATP} channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1035–1042, 2003.
 26. **O'Rourke B.** Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94: 420–432, 2004.
 27. **Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, and Downey JM.** Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 87: 460–466, 2000.
 28. **Raddatz E and Rochat AC.** Heterogeneity of oxidant stress in reoxygenated developing heart (Abstract). *J Mol Cell Cardiol* 34: A52, 2002.
 29. **Romano R, Rochat AC, Kucera P, De Ribaupierre Y, and Raddatz E.** Oxidative and glycogenolytic capacities within the developing chick heart. *Pediatr Res* 49: 363–372, 2001.
 30. **Rosa A, Maurly JP, Terrand J, Lyon X, Kucera P, Kappenberger L, and Raddatz E.** Ectopic pacing at physiological rate improves postanoxic recovery of the developing heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2384–H2392, 2003.
 31. **Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW, and Hunninghake GW.** Mitochondrial K_{ATP} channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C273–C281, 2002.
 32. **Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, and Giulivi C.** The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem* 276: 6945–6949, 2001.
 33. **Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, and Marban E.** Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 101: 439–445, 2000.
 34. **Sedmera D, Kucera P, and Raddatz E.** Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R379–R388, 2002.
 35. **Sordahl LA, Crow CA, Kraft GH, and Schwartz A.** Some ultrastructural and biochemical aspects of heart mitochondria associated with development: fetal and cardiomyopathic tissue. *J Mol Cell Cardiol* 4: 1–10, 1972.
 36. **Stamm C, Friehs I, Cowan DB, Cao-Danh H, Noria S, Munakata M, McGowan FX Jr, and del Nido PJ.** Post-ischemic PKC inhibition impairs myocardial calcium handling and increases contractile protein calcium sensitivity. *Cardiovasc Res* 51: 108–121, 2001.
 37. **Tenthorey D, de Ribaupierre Y, Kucera P, and Raddatz E.** Effects of verapamil and ryanodine on activity of the embryonic chick heart during anoxia and reoxygenation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31: 195–202, 1998.
 38. **Terrand J, Felley-Bosco E, Courjault-Gautier F, Rochat AC, Kucera P, and Raddatz E.** Postanoxic functional recovery of the developing heart is slightly altered by endogenous or exogenous nitric oxide. *Mol Cell Biochem* 252: 53–63, 2003.
 39. **Tohse N, Seki S, Kobayashi T, Tsutsuura M, Nagashima M, and Yamada Y.** Development of excitation-contraction coupling in cardiomyocytes. *Jpn J Physiol* 54: 1–6, 2004.
 40. **Tsuchida A, Miura T, Tanno M, Sakamoto J, Miki T, Kuno A, Matsumoto T, Ohnuma Y, Ichikawa Y, and Shimamoto K.** Infarct size limitation by nicorandil: roles of mitochondrial K_{ATP} channels, sarcolemmal K_{ATP} channels, and protein kinase C. *J Am Coll Cardiol* 40: 1523–1530, 2002.
 41. **Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, and Schumacker PT.** Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res* 86: 541–548, 2000.
 42. **Veenstra RD, Wang HZ, Westphale EM, and Beyer EC.** Multiple connexins confer distinct regulatory and conductance properties of gap junctions in developing heart. *Circ Res* 71: 1277–1283, 1992.
 43. **Warshaw JB.** Cellular energy metabolism during fetal development. IV. Fatty acid activation, acyl transfer and fatty acid oxidation during development of the chick and rat. *Dev Biol* 28: 537–544, 1972.
 44. **Wiens D, Jensen L, Jasper J, and Becker J.** Developmental expression of connexins in the chick embryo myocardium and other tissues. *Anat Rec* 241: 541–553, 1995.
 45. **Xu Z, Cohen MV, Downey JM, Vanden Hoek TL, and Yao Z.** Attenuation of oxidant stress during reoxygenation by AMP 579 in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2585–H2589, 2001.
 46. **Xu Z, Ji X, and Boysen PG.** Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial K_{ATP} channels and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1433–H1440, 2004.
 47. **Yao Z, McPherson BC, Liu H, Shao Z, Li C, Qin Y, Vanden Hoek TL, Becker LB, and Schumacker PT.** Signal transduction of flumazenil-induced preconditioning in myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1249–H1255, 2001.
 48. **Zanella B, Giordano E, Muscari C, Zini M, and Guarnieri C.** Nitric oxide synthase activity in rat cardiac mitochondria. *Basic Res Cardiol* 99: 159–164, 2004.

IV. Modulation de l'activité des MAPK au cours de l'anoxie et de la réoxygénation

Ces résultats préliminaires ont été présentés sous forme de résumé : (Sarre et al., 2005a)

IV.1. Introduction

IV.1.a. Activation de ERK et JNK par l'ischémie et la reperfusion

Comme indiqué dans le chapitre d'introduction, les observations concernant l'activation de JNK par l'ischémie sont divergentes. En effet, des études *in vivo* ou *in vitro* dans le cœur (Knight et Buxton, 1996; Hreniuk et al., 2001; Brigadeau et al., 2005) ou le rein (Pombo et al., 1994) ont montré qu'il y avait peu d'activation de JNK durant l'ischémie. A l'inverse, l'ischémie du myocarde ou de cardiomyocytes peut activer JNK (Omura et al., 1999; Yue et al., 2000; Ren et al., 2005). Les résultats divergent également en ce qui concerne l'activation de ERK, montrant (Yue et al., 2000; Ren et al., 2005), ou non (Omura et al., 1999) une activation durant l'ischémie. Dans tous les cas, une activation de ERK et/ou de JNK est observée à la reperfusion. Le profil d'activation de ces deux MAPK n'a pas été exploré dans le cœur embryonnaire.

IV.1.b. Rôle des MAPK dans la cardioprotection

Le préconditionnement ischémique peut entraîner une augmentation rapide de la phosphorylation de JNK et réduire ensuite le niveau de phosphorylation de la kinase après une ischémie/reperfusion par rapport aux cœurs non-traités (Sato et al., 2000). L'inhibition de la phosphorylation de JNK durant les épisodes préconditionnants d'ischémie-reperfusion atténue la protection apportée par l'IPC (Sato et al., 2000). Au contraire, l'inhibition de JNK améliore la récupération de la fonction diastolique (Yue et al., 2000) et diminue l'apoptose (Hreniuk et al., 2001; Ferrandi et al., 2004; Kaiser et al., 2005) à la suite d'un épisode d'ischémie.

Le préconditionnement ischémique se traduit également par une augmentation de la phosphorylation de ERK, durant le protocole mais aussi à la reperfusion (Mocanu et al., 2002; Hausenloy et al., 2005). L'inhibition de ERK abolit la protection induite par l'IPC (Mocanu et

al., 2002; *Hausenloy et al.*, 2005) ou par le TNF β (*Baxter et al.*, 2001) et augmente la mort de cellules en cultures (*Mizukami et al.*, 2004).

Il semble donc que le préconditionnement ischémique entraîne une augmentation immédiate de phosphorylation, suivie d'une inhibition de JNK et une activation de ERK lors de la reperfusion.

Les rares études ayant exploré la modulation de ERK et JNK par l'ouverture des canaux mitoK_{ATP} indiquent que la phosphorylation de ERK est augmentée par le diazoxide (*Samavati et al.*, 2002; *Kimura et al.*, 2005), et que l'inhibition de ERK abolit la protection induite par l'activation des canaux mitoK_{ATP} (*Samavati et al.*, 2002; *Gross et al.*, 2003). Le diazoxide semble également augmenter la phosphorylation normoxique de JNK (*Kimura et al.*, 2005).

IV.2. Résultats et discussion

IV.2.a. Profil d'activité de ERK

L'activité de ERK n'était pas modifiée par l'anoxie mais augmentait rapidement au début de la réoxygénation et décroissait après 60 minutes (Figure 24). L'activité maximale de ERK déterminée pendant la réoxygénation ne représentait que 1,5 fois l'activité déterminée pendant la stabilisation préanoxique.

Comparé à la condition contrôle (DMSO), l'ouverture des canaux mitoK_{ATP} par le diazoxide ne semble pas affecter l'activité de ERK durant la normoxie, l'anoxie, et la réoxygénation.

Ces résultats vont à l'inverse des données existantes pour le cœur adulte (*Samavati et al.*, 2002; *Kimura et al.*, 2005). Cependant, dans ces études, la concentration de diazoxide utilisée (100 à 200 μ M) était nettement supérieure à la concentration que nous avons employée (50 μ M). Cette différence de concentration, ainsi que la différence d'espèce ou de maturité mitochondriale pourrait expliquer que nos résultats diffèrent des leurs. Cela mériterait une étude complémentaire.

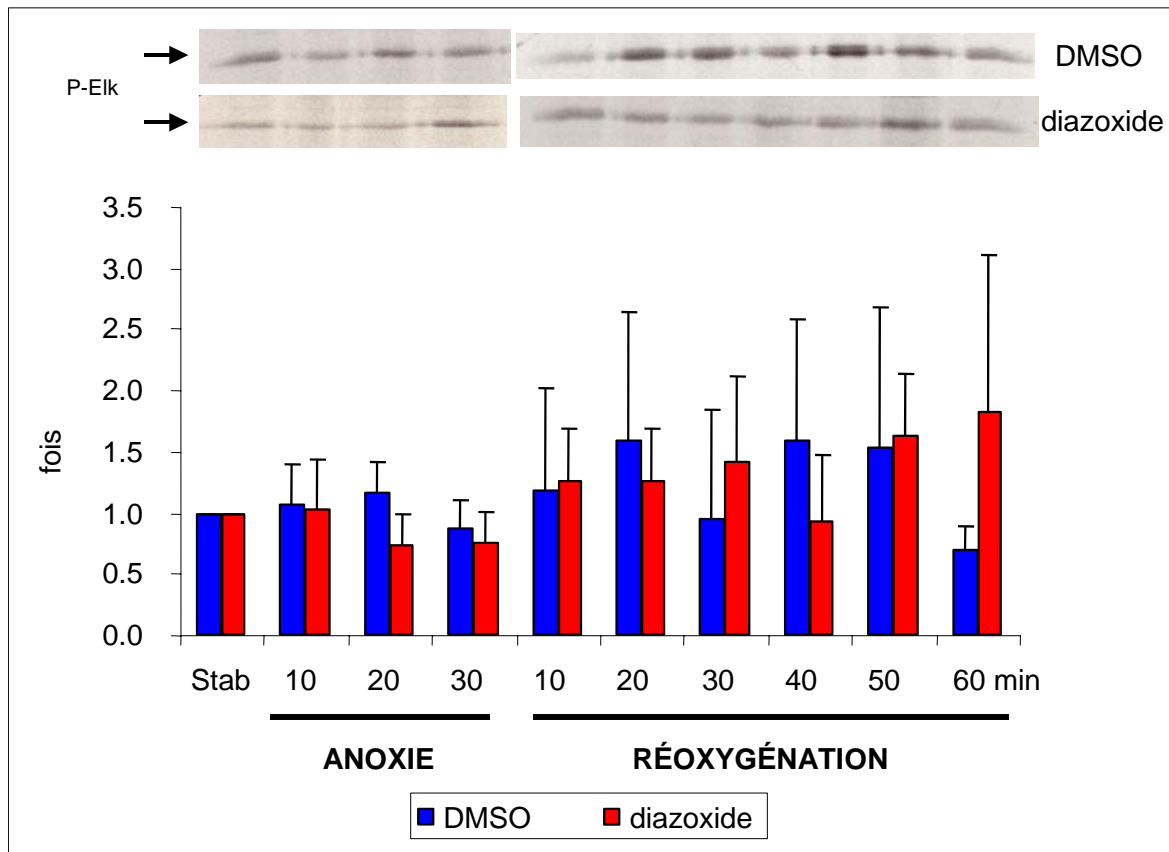


Figure 23 : Profil temporel d'activité de ERK. L'ouverture des canaux mitoK_{ATP} par diazoxide ne modifiait pas l'activité de ERK, stab : 45 min de stabilisation ; diazo : diazoxide ; P-Elk : phospho-elk (moyenne \pm DS ; n = 4).

IV.2.b. Profil d'activité de JNK

L'activité de JNK était légèrement augmentée après 10 et 20 minutes d'anoxie (Figure 24). La réoxygénation entraînait une augmentation progressive de l'activité de JNK qui culminait après 40 minutes. Cette activité était $4,4 \pm 1,3$ fois supérieure à celle déterminée avant l'anoxie (n=7). L'activité de la kinase diminuait ensuite progressivement.

IV.2.c. Effet de l'ouverture des canaux mitoK_{ATP} sur l'activité de JNK

L'activité de JNK était nettement diminuée par l'ouverture des canaux K_{ATP} mitochondriaux, essentiellement durant la réoxygénation. Cette diminution d'activité était significative à 30 et 40 minutes de réoxygénation ($p < 0,05$; Figure 25).

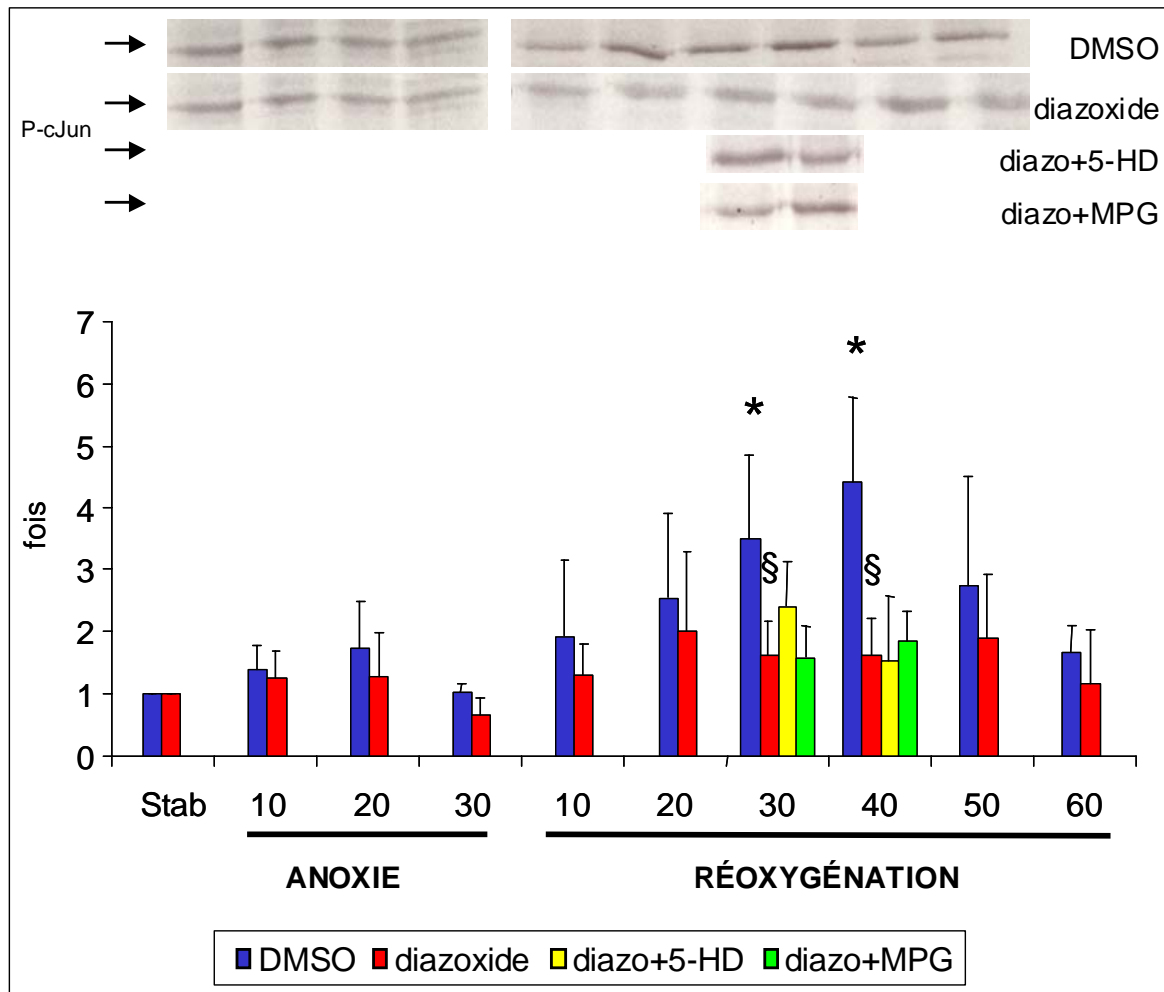


Figure 24 : Profil temporel d'activité de JNK en condition contrôle (DMSO). Le diazoxide diminuait cette activité durant la réoxygénation. L'inhibition des canaux mitoK_{ATP} (5-HD) inversait partiellement l'effet du diazoxide, à l'inverse du piègeur de radicaux MPG ; diazo : diazoxide ; Stab : 45 min de stabilisation (moyenne ± DS ; n=4-7). *: p<0,05 vs Stab, test t de Student apparié, § : p<0,05 vs DMSO, test t de Student.

Afin de vérifier la réversibilité de cet effet, nous avons traité des cœurs avec du diazoxide en présence de l'inhibiteur des canaux mitoK_{ATP}, le 5-HD. L'inhibition des canaux mitoK_{ATP} n'inversait que partiellement l'effet du diazoxide à 30 minutes de réoxygénation. A l'inverse, le piègeur de radicaux MPG ne semblait avoir aucun effet sur l'activité de JNK.

La diminution d'activité de JNK induite par le diazoxide lors de la réoxygénation observée dans notre travail correspond à celle qui peut être induite par l'IPC (Sato et al., 2000) mais est contraire à celle observée avec le diazoxide (Kimura et al., 2005). La différence de maturité mitochondriale et de concentration de diazoxide utilisée dans notre étude par

rapport à celle utilisée dans l'étude de Kimura et coll. pourrait expliquer la divergence des résultats. De plus, Kimura et coll. ont travaillé avec des cellules de mammifères adultes, et cette différence de modèle pourrait également être à l'origine des divergences observées. La diminution d'activité de JNK induite par le diazoxide semble être partiellement abolie par le 5-HD mais pas par le MPG après 30 minutes de réoxygénation. De plus, une étude a montré que les ROS ne modifiaient pas directement la phosphorylation de JNK (*Knight et Buxton, 1996*). L'inhibition de JNK par le diazoxide observée dans notre modèle, ne serait donc pas due aux ROS provenant de l'ouverture des canaux $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$.

Nos résultats ont donc montré que l'ouverture pharmacologique des canaux $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ diminuait l'activité de JNK pendant la réoxygénation, mais n'avait aucun effet sur l'activité de ERK. Ces résultats ont pu être récemment confirmés par des Western Blot réalisés par le Dr. Stéphanie Gardier dans le laboratoire. La diminution d'activité de JNK est significative après 30 et 40 minutes de réoxygénation, temps auxquels la récupération fonctionnelle est quasi complète. La diminution de l'activité de JNK pourrait donc jouer un rôle dans l'amélioration de la récupération postanoxique du couplage E-C ventriculaire induite par l'activation des canaux $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour caractériser les voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection induite par le diazoxide.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le contexte actuel des progrès en médecine fœtale et néonatale, ce travail a permis de caractériser les réponses électriques, mécaniques et biochimiques du cœur embryonnaire soumis à un stress hypoxique transitoire. En outre, certains mécanismes de cardioprotection ont été mis en évidence. L'approche expérimentale a été à la fois fonctionnelle (ECG, contractilité et production radicalaire), biochimique (activité kinase et glyco-gène) et pharmacologique (modulateurs des canaux K_{ATP}).

Ce travail a permis, pour la première fois, d'identifier dans le cœur embryonnaire, les types d'arythmies déclenchées par un manque d'oxygène suivi d'une réoxygénation. Ces arythmies ainsi que le stress oxydatif et la sidération du myocarde immature, ressemblent en grande partie à ce qui est observé dans le cœur adulte soumis à un épisode d'ischémie-reperfusion. De plus, le fait que l'oreillette tolère mieux l'anoxie-réoxygénation que le ventricule suggère qu'une sensibilité différentielle au stress s'établit précocement au cours de la cardiogenèse.

Concernant les mécanismes à l'origine de ces dysfonctionnements, nous avons pu démontrer le rôle important que le NO endogène et exogène jouait dans la récupération post-anoxique du couplage excitation-contraction ventriculaire. De plus, nos résultats prouvent que l'activation pharmacologique des canaux K_{ATP} mitochondriaux améliore cette récupération par des voies de signalisation cellulaire impliquant à la fois les radicaux d'oxygène, principalement d'origine mitochondriale, les protéines kinases C et le NO (Figure 25). Nous avons également montré que l'activation des canaux mito K_{ATP} réduisait l'activité de JNK pendant la réoxygénation, suggérant que cette MAP Kinase est impliquée dans les processus de cardioprotection.

Concernant les perspectives expérimentales, les troubles de la conduction auriculo-ventriculaire observés dans ce travail pourraient résulter d'une modification de la

conductance des jonctions communicantes, dont l'état de phosphorylation au cours de l'anoxie-réoxygénation pourrait être déterminé. D'autre part, il a été montré que le pore mitochondrial de perméabilité transitoire (MPTP) et les protéines découplantes (UCP) jouaient un rôle dans les voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection. Il est donc imaginable que l'activation des canaux mitoK_{ATP} soit aussi accompagnée d'une modification de ces protéines mitochondriales. Enfin, dans ce travail, nous ne nous sommes intéressés qu'aux MAP Kinases du ventricule, mais leur pattern spatial et temporel d'expression et d'activité dans le cœur embryonnaire mérite d'être établi. En effet, cette approche permettrait de déterminer si les différences régionales de tolérance myocardique à l'hypoxie-réoxygénation sont associées à une activation sélective de MAPK, par exemple p38, ERK ou JNK.

Le cœur embryonnaire isolé représente donc un modèle expérimental utile pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires responsables de la réponse myocardique à une hypoxie *in utero* et ainsi améliorer les stratégies thérapeutiques en cardiologie et en chirurgie fœtales.

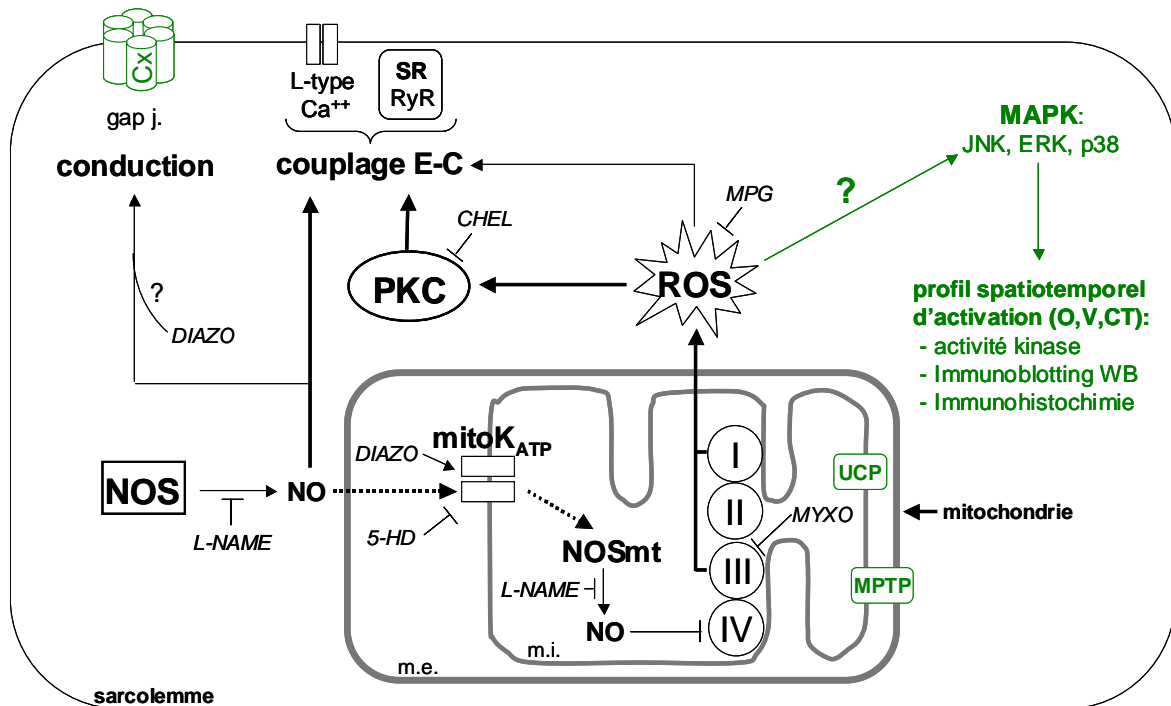


Figure 25 : modèle des voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection apportée par l'activation des canaux mitoK_{ATP} et, en vert, les perspectives expérimentales ; gap j. : jonctions communicantes ; Cx : connexines ; L-type Ca⁺⁺ : canaux calciques de type L ; RyR : canaux calciques couplés aux récepteurs à ryanodine ; SR : réticulum sarcoplasmique ; O : oreillette ; V : ventricule ; CT : conotruncus I-IV : complexes de la chaîne respiratoire ; UCP : protéine découplante ; MPTP : pore mitochondrial de perméabilité transitoire ; m.i., m.e. : membranes interne et externe de la mitochondrie (modifié de Sarre *et al.*, 2005b).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aikawa R, Nitta-Komatsubara Y, Kudoh S, Takano H, Nagai T, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I (2002) Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF-alpha. *Cytokine* 18(4): 179-183.
- Akao M, Ohler A, O'Rourke B, Marban E (2001) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circ Res* 88(12): 1267-1275.
- Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, Seharaseyon J, Marban E (2003) Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* 92(2): 186-194.
- Ala-Rami A, Ylitalo KV, Hassinen IE (2003) Ischaemic preconditioning and a mitochondrial KATP channel opener both produce cardioprotection accompanied by F1F0-ATPase inhibition in early ischaemia. *Basic Res Cardiol* 98(4): 250-258.
- Allen DG, Xiao XH (2003) Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 57(4): 934-941.
- Ambrosio G, Tritto I (2002) Myocardial reperfusion injury. *Eur Heart J Supplements* 4(Suppl B): B28-B30.
- Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA (2002) Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 105(2): 248-258.
- Ardehali H, Chen Z, Ko Y, Mejia-Alvarez R, Marban E (2004) Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(32): 11880-11885.
- Arduini A, Mezzetti A, Porreca E, Lapenna D, DeJulia J, Marzio L, Polidoro G, Cucurullo F (1988) Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta* 970(2): 113-121.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38(2): 367-374.
- Argaud L, Ovize M (2000) [Myocardial metabolism abnormalities during ischemia and reperfusion]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 93(1): 87-90.

- Assaleh K, Al-Nashash H (2005) A novel technique for the extraction of fetal ECG using polynomial networks. *IEEE Trans Biomed Eng* 52(6): 1148-1152.
- Babsky A, Hekmatyar S, Wehrli S, Doliba N, Osbakken M, Bansal N (2002) Influence of ischemic preconditioning on intracellular sodium, pH, and cellular energy status in isolated perfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(7): 520-528.
- Bai J, Cederbaum AI (2001) Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept* 10(3-4): 189-199.
- Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM (1999) Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): H1361-1368.
- Baker JE, Contney SJ, Singh R, Kalyanaraman B, Gross GJ, Bosnjak ZJ (2001) Nitric oxide activates the sarcolemmal K(ATP) channel in normoxic and chronically hypoxic hearts by a cyclic GMP-dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 33(2): 331-341.
- Balligand JL (1999) Regulation of cardiac beta-adrenergic response by nitric oxide. *Cardiovasc Res* 43(3): 607-620.
- Baxter GF, Mocanu MM, Brar BK, Latchman DS, Yellon DM (2001) Cardioprotective effects of transforming growth factor-beta1 during early reoxygenation or reperfusion are mediated by p42/p44 MAPK. *J Cardiovasc Pharmacol* 38(6): 930-939.
- Bell MR (2004) GP91phox NADPH oxidase ROS generation is a required signalling step in ischaemic preconditioning. *The News Bulletin of the International Society for Heart Research* 12(3): 6-7.
- Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC (2001) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38(5): 1107-1111.
- Bienengraeber M, Alekseev AE, Abraham MR, Carrasco AJ, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja PP, Terzic A (2000) ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. *Faseb J* 14(13): 1943-1952.
- Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Ruiz-Meana M, Gres P, Konietzka I, Lopez-Iglesias C, Garcia-Dorado D, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R (2005) Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 67(2): 234-244.
- Bolli R (2001) 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(11): 1897-1918.

- Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Zhang J, Takano H (1998). Delayed Preconditioning Against Myocardial Stunning : Role of Nitric Oxide as Trigger and Mediator. In: *Delayed Preconditioning and Adaptative Cardioprotection*. Baxter GF, Yellon DM (Kluwer Academic Publishers): p. 29-46.
- Bolli R, Marban E (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol OT* 79(2): 609-634.
- Bonaventura J, Gow A (2004) NO and superoxide: opposite ends of the seesaw in cardiac contractility. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(47): 16403-16404.
- Boucek RJ, Murphy WP, Jr., Paff GH (1959) Electrical and mechanical properties of chick embryo heart chambers. *Circ Res* 7: 787-793.
- Bouwman RA, Musters RJ, van Beek-Harmsen BJ, de Lange JJ, Boer C (2004) Reactive oxygen species precede protein kinase C-delta activation independent of adenosine triphosphate-sensitive mitochondrial channel opening in sevoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 100(3): 506-514.
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128(3): 617-630.
- Brigadeau F, Gele P, Marquie C, Soudan B, Lacroix D (2005) Ventricular arrhythmias following exposure of failing hearts to oxidative stress in vitro. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16(6): 629-636.
- Brown GC, Borutaite V (2001) Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52(3-5): 189-195.
- Carroll R, Gant VA, Yellon DM (2001) Mitochondrial K(ATP) channel opening protects a human atrial-derived cell line by a mechanism involving free radical generation. *Cardiovasc Res* 51(4): 691-700.
- Charlat ML, O'Neill PG, Hartley CJ, Roberts R, Bolli R (1989) Prolonged abnormalities of left ventricular diastolic wall thinning in the "stunned" myocardium in conscious dogs: time course and relation to systolic function. *J Am Coll Cardiol* 13(1): 185-194.
- Cohen MV, Baines CP, Downey JM (2000) Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol* 62: 79-109.
- Cotton JM, Kearney MT, Shah AM (2002) Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart* 88(6): 564-566.
- Das B, Sarkar C (2003a) Cardiomyocyte mitochondrial K(ATP) channels participate in the antiarrhythmic and antiinfarct effects of K(ATP) activators during ischemia and reperfusion in an intact anesthetized rabbit model. *Pol J Pharmacol* 55(5): 771-776.

- Das B, Sarkar C (2003b) Mitochondrial K(ATP) channel activation is important in the antiarrhythmic and cardioprotective effects of non-hypotensive doses of nicorandil and cromakalim during ischemia/reperfusion: a study in an intact anesthetized rabbit model. *Pharmacol Res* 47(6): 447-461.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18(6): 655-673.
- Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Thambo JB, Tariosse L, Garlid KD (2002) Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(1): H284-295.
- Driamov S, Bellahcene M, Ziegler A, Barbosa V, Traub D, Butz S, Buser PT, Zaugg CE (2004) Antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning during low-flow ischemia. The role of bradykinin and sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K(+) channels. *Basic Res Cardiol* 99(4): 299-308.
- Dzeja PP, Bast P, Ozcan C, Valverde A, Holmuhamedov EL, Van Wylen DG, Terzic A (2003) Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(4): H1048-1056.
- Eaton M, Hernandez L, Schaefer S (2005) Ischemic preconditioning and diazoxide limit mitochondrial Ca²⁺ overload during ischemia/reperfusion: Role of reactive oxygen species. *Exp Clin Cardiol* 10(2): 96-103.
- Eliseev RA, Vanwinkle B, Rosier RN, Gunter TE (2004) Diazoxide-mediated preconditioning against apoptosis involves activation of cAMP-response element-binding protein (CREB) and NFkappaB. *J Biol Chem* 279(45): 46748-46754.
- Enkvetchakul D, Nichols CG (2003) Gating mechanism of KATP channels: function fits form. *J Gen Physiol* 122(5): 471-480.
- Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ (2005) Mitochondrial ATP-Sensitive K⁺ Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. *J Bioenerg Biomembr* 37(2): 75-82.
- Feng J, Li H, Rosenkranz ER (2003) K(ATP) channel opener protects neonatal rabbit heart better than St. Thomas' solution. *J Surg Res* 109(2): 69-73.
- Ferrandi C, Ballerio R, Gaillard P, Giachetti C, Carboni S, Vitte PA, Gotteland JP, Cirillo R (2004) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 142(6): 953-960.

- Ferranti R, da Silva MM, Kowaltowski AJ (2003) Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening decreases reactive oxygen species generation. *FEBS Lett* 536(1-3): 51-55.
- Ferrari R, Guardigli G, Mele D, Percoco GF, Ceconi C, Curello S (2004) Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des* 10(14): 1699-1711.
- Fitzpatrick CM, Shi Y, Hutchins WC, Su J, Gross GJ, Ostadal B, Tweddell JS, Baker JE (2005) Cardioprotection in chronically hypoxic rabbits persists on exposure to normoxia: role of NOS and KATP channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(1): H62-68.
- Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E (2001) Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ Res* 88(8): 802-809.
- Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ (2000) Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(1): H305-312.
- Fujita A, Kurachi Y (2000) Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol Ther* 85(1): 39-53.
- Ganote CE (1983) Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 15(2): 67-73.
- Gao F, Yue TL, Shi DW, Christopher TA, Lopez BL, Ohlstein EH, Barone FC, Ma XL (2002) p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation. *Cardiovasc Res* 53(2): 414-422.
- Garlid KD (2000) Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol* 95(4): 275-279.
- Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P (2003) Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* 1606(1-3): 1-21.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ (1997) Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 81(6): 1072-1082.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA (1996) The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem* 271(15): 8796-8799.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G, Lenaz G (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is

- not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett* 505(3): 364-368.
- Giordano FJ (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* 115(3): 500-508.
- Gourine AV, Molosh AI, Poputnikov D, Bulhak A, Sjoquist PO, Pernow J (2005) Endothelin-1 exerts a preconditioning-like cardioprotective effect against ischaemia/reperfusion injury via the ET(A) receptor and the mitochondrial K(ATP) channel in the rat in vivo. *Br J Pharmacol* 144(3): 331-337.
- Grigoriev SM, Skarga YY, Mironova GD, Marinov BS (1999) Regulation of mitochondrial KATP channel by redox agents. *Biochim Biophys Acta* 1410(1): 91-96.
- Gross ER, Peart JN, Hsu AK, Grover GJ, Gross GJ (2003) K(ATP) opener-induced delayed cardioprotection: involvement of sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels, free radicals and MEK1/2. *J Mol Cell Cardiol* 35(8): 985-992.
- Gryshchenko O, Fischer IR, Dittrich M, Viatchenko-Karpinski S, Soest J, Bohm-Pinger MM, Igelmund P, Fleischmann BK, Hescheler J (1999) Role of ATP-dependent K(+) channels in the electrical excitability of early embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cell Sci* 112 (Pt 17): 2903-2912.
- Gupte SA, Kaminski PM, Floyd B, Agarwal R, Ali N, Ahmad M, Edwards J, Wolin MS (2005) Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(1): H13-21.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA (2004) Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61(3): 372-385.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1998a). Detection of hydrogen peroxide. In: *Free Radicals in Biology and Medicine, Third edition*, ed. (Oxford University Press): p. 380-388.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1998b). Oxygen is a toxic gas - an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine., Third edition*, ed. Oxford (Oxford University Press): p. 1-35.
- Hamburger V, Hamilton H (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88: 49-92.
- Hanley PJ, Daut J (2005) K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 39(1): 17-50.

- Harada N, Miura T, Dairaku Y, Kametani R, Shibuya M, Wang R, Kawamura S, Matsuzaki M (2004) NO donor-activated PKC-delta plays a pivotal role in ischemic myocardial protection through accelerated opening of mitochondrial K-ATP channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(1): 35-41.
- Hare JM (2003) Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 35(7): 719-729.
- Hausenloy D, Wynne A, Duchen M, Yellon D (2004) Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 109(14): 1714-1717.
- Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM (2005) Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(2): H971-976.
- Hearse DJ (1992). Myocardial injury during ischemia and reperfusion. Concepts and controversies. In: *Myocardial Protection: The Pathophysiology of Reperfusion and Reperfusion Injury* Raven Press L13-33.
- Herrero A, Barja G (2000) Localization of the Site of Oxygen Radical Generation inside the Complex I of Heart and Nonsynaptic Brain Mammalian Mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32(6): 609-615.
- Herrero A, Barja G (1997) Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev* 98(2): 95-111.
- Heusch G (1998) Hibernating myocardium. *Physiol Rev* 78(4): 1055-1085.
- Hoff EC, Kramer TC, Dubois D, Patten BM (1939) The development of the electrocardiogram of the embryonic heart. *The American Heart Journal* 17: 471-488.
- Hoffmeister HM, Mauser M, Schaper W (1986) Repeated short periods of regional myocardial ischemia: effect on local function and high energy phosphate levels. *Basic Res Cardiol* 81(4): 361-372.
- Hreniuk D, Garay M, Gaarde W, Monia BP, McKay RA, Cioffi CL (2001) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 59(4): 867-874.
- Ichinose M, Yonemochi H, Sato T, Saikawa T (2003) Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(6): H2235-2241.

- Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T (1991) ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 352(6332): 244-247.
- Jain SK, Schuessler RB, Saffitz JE (2003) Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. *Circ Res* 92(10): 1138-1144.
- Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND (2002) The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 73(4): 493-499.
- Javadov S, Huang C, Kirshenbaum L, Karmazyn M (2005) NHE-1 inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 38(1): 135-143.
- Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R (1994) Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am J Cardiol* 73(6): 2B-7B.
- Kaiser RA, Liang Q, Bueno OF, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett TE, Molkenin JD (2005) Genetic inhibition or activation of JNK1/2 each protect the Myocardium from Ischemia-reperfusion-induced cell death in vivo. *J Biol Chem* 280(38): 32602-32608.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 14126-14131.
- Kaneko M, Masuda H, Suzuki H, Matsumoto Y, Kobayashi A, Yamazaki N (1993) Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. *Mol Cell Biochem* 125(2): 163-169.
- Kelly RG (2002). Cardiopathies congénitales: apports des modèles murins. In: *Biologie et Pathologie du Coeur et des Vaisseaux* Flammarion 631-645.
- Khaliulin I, Schwalb H, Wang P, Houminer E, Grinberg L, Katzeff H, Borman JB, Powell SR (2004) Preconditioning improves postischemic mitochondrial function and diminishes oxidation of mitochondrial proteins. *Free Radic Biol Med* 37(1): 1-9.
- Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2005) A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 97(7): 629-636.
- Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Abe Y (2005) Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 45(3): 438-444.

- Knight RJ, Buxton DB (1996) Stimulation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 218(1): 83-88.
- Kolesari GL, Schnitzler HJ, Rajala GM, Lewan RB, Kaplan S (1988) The antidysrhythmic effect of metoprolol in the epinephrine treated chick embryo. *Life Sci* 42(11): 1159-1163.
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Grijalba MT, Bechara EJ, Vercesi AE (1996) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J Biol Chem* 271(6): 2929-2934.
- Krause KH (2004) Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57(5): S28-29.
- Krenz M, Oldenburg O, Wimpee H, Cohen MV, Garlid KD, Critz SD, Downey JM, Benoit JN (2002) Opening of ATP-sensitive potassium channels causes generation of free radicals in vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 97(5): 365-373.
- Kristiansen SB, Nielsen-Kudsk JE, Botker HE, Nielsen TT (2005) Effects of KATP channel modulation on myocardial glycogen content, lactate, and amino acids in nonischemic and ischemic rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 45(5): 456-461.
- Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT (2002) Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(6): L1324-1329.
- Lacza Z, Snipes JA, Kis B, Szabo C, Grover G, Busija DW (2003a) Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K(+) channel in the brain. *Brain Res* 994(1): 27-36.
- Lacza Z, Snipes JA, Miller AW, Szabo C, Grover G, Busija DW (2003b) Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol* 35(11): 1339-1347.
- Ladilov Y, Maxeiner H, Wolf C, Schafer C, Meuter K, Piper HM (2002) Role of protein phosphatases in hypoxic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(3): H1092-1098.
- Larsen CM, Wadt KA, Juhl LF, Andersen HU, Karlsen AE, Su MS, Seedorf K, Shapiro L, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T (1998) Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requires both the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273(24): 15294-15300.
- Lau C, Rogers JM (2004) Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood. *Birth Defects Res C Embryo Today* 72(4): 300-312.

- Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, Vanden Hoek TL (2003) ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(1): H299-308.
- Lecoultre V, Sarre A, Schenk F, Raddatz E (2004) Erythropoietin affects atrial glycogen metabolism and atrio-ventricular conduction in the anoxic-reoxygenated developing heart. *10th Cardiovascular Biology and Clinical Implications Meeting* (Abstract 59).
- Lecour S, Rochette L, Opie L (2005) Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection. *Cardiovasc Res* 65(1): 239-243.
- Leducq N, Bono F, Sulpice T, Vin V, Janiak P, Fur GL, O'Connor SE, Herbert JM (2003) Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 306(3): 828-837.
- Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH (2002) Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res* 33(2): 72-80.
- Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL (2001) Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33(6): 1065-1089.
- Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(2): C227-241.
- Li G, Bae S, Zhang L (2004) Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(5): H1712-1719.
- Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM (2002) Essential role of the NADPH oxidase subunit p47(phox) in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 90(2): 143-150.
- Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2004) Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(4): 473-479.
- Liu H, Zhang HY, Zhu X, Shao Z, Yao Z (2002) Preconditioning blocks cardiocyte apoptosis: role of K(ATP) channels and PKC-epsilon. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(4): H1380-1386.

- Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD (2003) Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res* 93(6): 573-580.
- Logue SE, Gustafsson AB, Samali A, Gottlieb RA (2005) Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol* 38(1): 21-33.
- Lopaschuk GD, Collins-Nakai RL, Itoi T (1992) Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res* 26(12): 1172-1180.
- Louch WE, Ferrier GR, Howlett SE (2002) Changes in excitation-contraction coupling in an isolated ventricular myocyte model of cardiac stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(2): H800-810.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lyon X, Kappenberger L, Sedmera D, Rochat AC, Kucera P, Raddatz E (2001) Pacing redistributes glycogen within the developing myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 33(3): 513-520.
- MacCarthy PA, Shah AM (2003) Oxidative stress and heart failure. *Coron Artery Dis* 14(2): 109-113.
- Mackay K, Mochly-Rosen D (2001) Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 33(7): 1301-1307.
- Manner J (2000) Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec* 259(3): 248-262.
- Mansfield KD, Simon MC, Keith B (2004) Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 97(4): 1358-1366.
- Marczin N, Bundy RE, Hoare GS, Yacoub M (2003) Redox regulation following cardiac ischemia and reperfusion. *Coron Artery Dis* 14(2): 123-133.
- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ (2004) Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. *J Mol Med* 82(9): 565-578.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93(5): 388-398.
- Maury JP, Sarre A, Terrand J, Rosa A, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E (2004) Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered

- by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide. *Mol Cell Biochem* 265: 141-149.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
- McLennan HR, Degli Esposti M (2000) The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J Bioenerg Biomembr* 32(2): 153-162.
- Meilz A, Kucera P, de Ribaupierre Y, Raddatz E (1998) Inhibition of bicarbonate transport protects embryonic heart against reoxygenation-induced dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 30(2): 327-335.
- Mellin V, Isabelle M, Oudot A, Vergely-Vandriessse C, Monteil C, Di Meglio B, Henry JP, Dautreux B, Rochette L, Thuillez C, Mulder P (2005) Transient reduction in myocardial free oxygen radical levels is involved in the improved cardiac function and structure after long-term allopurinol treatment initiated in established chronic heart failure. *Eur Heart J* 26(15): 1544-1550.
- Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R (1993) Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 268(35): 26286-26295.
- Michel MC, Li Y, Heusch G (2001) Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363(3): 245-266.
- Minners J, Lacerda L, McCarthy J, Meiring JJ, Yellon DM, Sack MN (2001) Ischemic and pharmacological preconditioning in Girardi cells and C2C12 myotubes induce mitochondrial uncoupling. *Circ Res* 89(9): 787-792.
- Mizukami Y, Iwamatsu A, Aki T, Kimura M, Nakamura K, Nao T, Okusa T, Matsuzaki M, Yoshida K, Kobayashi S (2004) ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *J Biol Chem* 279(48): 50120-50131.
- Mocanu MM, Bell RM, Yellon DM (2002) PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 34(6): 661-668.
- Moon CH, Kim MY, Kim MJ, Kim MH, Lee S, Yi KY, Yoo SE, Lee DH, Lim H, Kim HS, Lee SH, Baik EJ, Jung YS (2004) KR-31378, a novel benzopyran analog, attenuates hypoxia-induced cell death via mitochondrial KATP channel and protein kinase C-epsilon in heart-derived H9c2 cells. *Eur J Pharmacol* 506(1): 27-35.

- Moorman AF, Schumacher CA, de Boer PA, Hagoort J, Bezstarosti K, van den Hoff MJ, Wagenaar GT, Lamers JM, Wuytack F, Christoffels VM, Fiolet JW (2000) Presence of functional sarcoplasmic reticulum in the developing heart and its confinement to chamber myocardium. *Dev Biol* 223(2): 279-290.
- Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M (2005) SUR, ABC proteins targeted by K(ATP) channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 38(6): 951-963.
- Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E (2001) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res* 89(10): 891-898.
- Murrant CL, Reid MB (2001) Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech* 55(4): 236-248.
- Murray J, Taylor SW, Zhang B, Ghosh SS, Capaldi RA (2003) Oxidative damage to mitochondrial complex I due to peroxynitrite: identification of reactive tyrosines by mass spectrometry. *J Biol Chem* 278(39): 37223-37230.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5): 1124-1136.
- Nagata K, Obata K, Odashima M, Yamada A, Somura F, Nishizawa T, Ichihara S, Izawa H, Iwase M, Hayakawa A, Murohara T, Yokota M (2003) Nicorandil inhibits oxidative stress-induced apoptosis in cardiac myocytes through activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and a nitrate-like effect. *J Mol Cell Cardiol* 35(12): 1505-1512.
- Nahorski SR, Rogers KJ (1972) An enzymic fluorometric micro method for determination of glycoen. *Anal Biochem* 49(2): 492-497.
- Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV (2000) Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 32(7): 1159-1167.
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2002). Respiratory Chains. In: *Bioenergetics 3* (Academic Press): p. 89-131.
- Noma A (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305(5930): 147-148.
- Nozawa Y, Miura T, Miki T, Ohnuma Y, Yano T, Shimamoto K (2003) Mitochondrial K(ATP) channel-dependent and -independent phases of ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rat. *Basic Res Cardiol* 98(1): 50-58.

- Ockaili R, Emani VR, Okubo S, Brown M, Krottapalli K, Kukreja RC (1999) Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 277(6 Pt 2): H2425-2434.
- Oldenburg O, Yang XM, Krieg T, Garlid KD, Cohen MV, Grover GJ, Downey JM (2003) P1075 opens mitochondrial K(ATP) channels and generates reactive oxygen species resulting in cardioprotection of rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 35(9): 1035-1042.
- Omura T, Yoshiyama M, Shimada T, Shimizu N, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J (1999) Activation of mitogen-activated protein kinases in in vivo ischemia/reperfused myocardium in rats. *J Mol Cell Cardiol* 31(6): 1269-1279.
- Ono H, Osanai T, Ishizaka H, Hanada H, Kamada T, Onodera H, Fujita N, Sasaki S, Matsunaga T, Okumura K (2004) Nicorandil improves cardiac function and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: role of inhibitory effect on reactive oxygen species formation. *Am Heart J* 148(4): E15.
- O'Rourke B (2004) Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 94(4): 420-432.
- O'Rourke B, Cortassa S, Aon MA (2005) Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)* 20: 303-315.
- Ozcan C, Bienengraeber M, Dzeja PP, Terzic A (2002) Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(2): H531-539.
- Paff GH, Boucek RJ (1975) Conal contribution to the electrocardiogram of chick embryo hearts. *Anat Rec* 182(2): 169-173.
- Paff GH, Boucek RJ (1962) Simultaneous electrocardiograms and myograms of the isolated atrium, ventricle and conus of the embryonic chick heart. *Anat Rec* 142: 73-79.
- Paff GH, Boucek RJ, Harrell TC (1968) Observations on the development of the electrocardiogram. *Anat Rec* 160(3): 575-582.
- Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM (2000) Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 87(6): 460-466.
- Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1985) Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations. *Arch Biochem Biophys* 236(2): 691-702.

- Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1986) Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 250(5 Pt 2): H741-748.
- Park JW, Roh HY, Jung IS, Yun YP, Yi KY, Yoo SE, Kwon SH, Chung HJ, Shin HS (2005) Effects of [5-(2-Methoxy-5-fluorophenyl)furan-2-ylcarbonyl]guanidine (KR-32560), a Novel Sodium/Hydrogen Exchanger-1 Inhibitor, on Myocardial Infarct Size and Ventricular Arrhythmias in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion Heart Injury. *J Pharmacol Sci* 98(4): 439-449.
- Paszty K, Verma AK, Padanyi R, Filoteo AG, Penniston JT, Enyedi A (2002) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis. *J Biol Chem* 277(9): 6822-6829.
- Patel HH, Gross GJ (2001) Diazoxide induced cardioprotection: what comes first, K(ATP) channels or reactive oxygen species? *Cardiovasc Res* 51(4): 633-636.
- Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD (1992) Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 267(36): 26062-26069.
- Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Garlid KD (1996) Inhibition of the mitochondrial KATP channel by long-chain acyl-CoA esters and activation by guanine nucleotides. *J Biol Chem* 271(50): 32084-32088.
- Pearlstein DP, Ali MH, Mungai PT, Hynes KL, Gewertz BL, Schumacker PT (2002) Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(4): 566-573.
- Perrin C, Vergely C, Rochette L (2004) [Calpains and cardiac diseases]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 53(5): 259-266.
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G (2003) Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Faseb J*.
- Pham FH, Sugden PH, Clerk A (2000) Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res* 86(12): 1252-1258.
- Piper HM, Garcia-Dorado D (1999) Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *Ann Thorac Surg* 68(5): 1913-1919.
- Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M (1998) A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38(2): 291-300.

- Piper HM, Meuter K, Schafer C (2003) Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 75(2): S644-648.
- Poitry S, van Bever L, Coppex F, Roatti A, Baertschi AJ (2003) Differential sensitivity of atrial and ventricular K(ATP) channels to metabolic inhibition. *Cardiovasc Res* 57(2): 468-476.
- Pombo CM, Bonventre JV, Avruch J, Woodgett JR, Kyriakis JM, Force T (1994) The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 269(42): 26546-26551.
- Portenhauser R, Schafer G, Trolp R (1971) Inhibition of mitochondrial metabolism by the diabetogenic thiadiazine diazoxide. II. Interaction with energy conservation and ion transport. *Biochem Pharmacol* 20(10): 2623-2632.
- Quast U, Stephan D, Bieger S, Russ U (2004) The impact of ATP-sensitive K⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes* 53 Suppl 3: S156-164.
- Raddatz E, Kucera P, de Ribaupierre Y (1997) Response of the embryonic heart to hypoxia and reoxygenation : An in vitro model. *Exp Clin Cardiol* 2(2): 128-134.
- Raddatz E, Maury JP, Kucera P, Kappenberger L, Sarre A (2005) Characterization of arrhythmias in the developing heart subjected to anoxia-reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* 38(6): 1058 (Abstract N°1167).
- Raddatz E, Rochat AC (2002) Heterogeneity of oxidant stress in reoxygenated developing heart. *J Mol Cell Cardiol* 34(6): A52 (Abstract).
- Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Xing Y, Maeda H (2004) Ischemic preconditioning prevents reperfusion heart injury in cardiac hypertrophy by activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Int J Cardiol* 96(1): 41-49.
- Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y, Muslin AJ (2005) Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 38(4): 617-623.
- Robinet A, Hoizey G, Millart H (2005) PI 3-kinase, protein kinase C, and protein kinase A are involved in the trigger phase of beta1-adrenergic preconditioning. *Cardiovasc Res* 66(3): 530-542.
- Rodrigo GC, Standen NB (2005) Role of mitochondrial re-energization and Ca(2+) influx in reperfusion injury of metabolically inhibited cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 67(2): 291-300.

- Romano R, Rochat AC, Kucera P, De Ribaupierre Y, Raddatz E (2001) Oxidative and glycogenolytic Capacities within the developing chick heart. *Pediatr Res* 49(3): 363-372.
- Rosa A, Maury JP, Terrand J, Lyon X, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E (2003) Ectopic pacing at physiological rate improves postanoxic recovery of the developing heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(6): H2384-2392.
- Rousou AJ, Ericsson M, Federman M, Levitsky S, McCully JD (2004) Opening of mitochondrial KATP channels enhances cardioprotection through the modulation of mitochondrial matrix volume, calcium accumulation, and respiration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(5): H1967-1976.
- Rumsey WL, Abbott B, Bertelsen D, Mallamaci M, Hagan K, Nelson D, Erecinska M (1999) Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol* 276(1 Pt 2): H71-80.
- Saavedra WF, Paolucci N, St John ME, Skaf MW, Stewart GC, Xie JS, Harrison RW, Zeichner J, Mudrick D, Marban E, Kass DA, Hare JM (2002) Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circ Res* 90(3): 297-304.
- Sakai T, Yada T, Hirota A, Komuro H, Kamino K (1998) A regional gradient of cardiac intrinsic rhythmicity depicted in embryonic cultured multiple hearts. *Pflugers Arch* 437(1): 61-69.
- Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW, Hunninghake GW (2002) Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(1): C273-281.
- Sarre A, Gardier S, Thomas AC, Raddatz E (2005a) MitoKATP channel opening differentially modulates JNK, ERK and p38 MAPK activation in the developing heart submitted to anoxia-reoxygenation. *Kardiovaskuläre Medizin - Médecine cardiovasculaire* 8(Suppl 10): S16 (Abstract P38).
- Sarre A, Lange N, Kucera P, Raddatz E (2005b) mitoKATP channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(4): H1611-1619.
- Sarre A, Maury JP, Kappenberger L, Raddatz E (2005c) Electrocardiographic characterization of the embryonic heart subjected to anoxia-reoxygenation: an in vitro model. *Europace* 7(Supplement 1): 73 (Abstract 356).

- Sarre A, Maury JP, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E (2005d) Characterization of arrhythmias in the developing heart subjected to anoxia-reoxygenation. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98(4): 390 (Abstract 06-18)).
- Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E (2000) Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 101(4): 439-445.
- Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK (2000) SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(3): H901-907.
- Schafer G, Portenhauser R, Trolp R (1971) Inhibition of mitochondrial metabolism by the diabetogenic thiadiazine diazoxide. I. Action on succinate dehydrogenase and TCA-cycle oxidations. *Biochem Pharmacol* 20(6): 1271-1280.
- Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ (1996) Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res* 78(6): 1100-1104.
- Schulz R, Belosjorow S, Gres P, Jansen J, Michel MC, Heusch G (2002) p38 MAP kinase is a mediator of ischemic preconditioning in pigs. *Cardiovasc Res* 55(3): 690-700.
- Schulz R, Heusch G (2004) Connexin 43 and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 62(2): 335-344.
- Sedmera D, Kucera P, Raddatz E (2002) Developmental changes in cardiac recovery from anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(2): R379-388.
- Seharaseyon J, Ohler A, Sasaki N, Fraser H, Sato T, Johns DC, O'Rourke B, Marban E (2000) Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 32(11): 1923-1930.
- Servais S. 2004. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3: Thèse; Université Claude Bernard.
- Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, Altomare E, Fiore T, Vendemiale G (2005) Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *Faseb J* 19(3): 354-361.
- Seubert J, Yang B, Bradbury JA, Graves J, Degraff LM, Gabel S, Gooch R, Foley J, Newman J, Mao L, Rockman HA, Hammock BD, Murphy E, Zeldin DC (2004) Enhanced postischemic functional recovery in CYP2J2 transgenic hearts involves mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and p42/p44 MAPK pathway. *Circ Res* 95(5): 506-514.

- Shiono N, Rao V, Weisel RD, Kawasaki M, Li RK, Mickle DA, Fedak PW, Tumiati LC, Ko L, Verma S (2002) L-arginine protects human heart cells from low-volume anoxia and reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(3): H805-815.
- Shite J, Qin F, Mao W, Kawai H, Stevens SY, Liang C (2001) Antioxidant vitamins attenuate oxidative stress and cardiac dysfunction in tachycardia-induced cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 38(6): 1734-1740.
- Singh H, Hudman D, Lawrence CL, Rainbow RD, Lodwick D, Norman RI (2003) Distribution of Kir6.0 and SUR2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35(5): 445-459.
- Snabaitis AK, Hearse DJ, Avkiran M (2002) Regulation of sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange by hydrogen peroxide in adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 53(2): 470-480.
- Sordahl LA, Crow CA, Kraft GH, Schwartz A (1972) Some ultrastructural and biochemical aspects of heart mitochondria associated with development: fetal and cardiomyopathic tissue. *J Mol Cell Cardiol* 4(1): 1-10.
- Souchard J-P, Arnal JF, Rochette L (2002). Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire. Techniques permettant la mise en évidence d'un stress oxydatif en biologie. In: *Biologie et Pathologie du Coeur et des Vaisseaux* Flammarion 245-257.
- Staniek K, Nohl H (2000) Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* 1460(2-3): 268-275.
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15235-15240.
- Sugiyama T, Miyazaki H, Saito K, Shimada H, Miyamoto K (1996) Chick embryos as an alternative experimental animal for cardiovascular investigations: stable recording of electrocardiogram of chick embryos in ovo on the 16th day of incubation. *Toxicol Appl Pharmacol* 138(2): 262-267.
- Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK (2005) NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res* 96(6): 659-666.
- Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K (1997) Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 241(3): 693-697.

- Suzuki M, Saito T, Sato T, Tamagawa M, Miki T, Seino S, Nakaya H (2003) Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in mice. *Circulation* 107(5): 682-685.
- Suzuki S, Kaneko M, Chapman DC, Dhalla NS (1991) Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals. *Biochim Biophys Acta* 1074(1): 95-100.
- Tang XL, Takano H, Rizvi A, Turrens JF, Qiu Y, Wu WJ, Zhang Q, Bolli R (2002) Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(1): H281-291.
- Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F (2004) Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. *Diabetes* 53 Suppl 3: S113-122.
- Tazawa H, Hou P (1997). Avian cardiovascular development. In: *Development of Cardiovascular Systems- Molecules to Organisms* Burggren WW, Keller B (Cambridge University Press): p. 193-210.
- Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, Dhalla NS (1999) Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am J Physiol* 277(2 Pt 2): H584-594.
- Tenthorey D, de Ribaupierre Y, Kucera P, Raddatz E (1998) Effects of verapamil and ryanodine on activity of the embryonic chick heart during anoxia and reoxygenation. *J Cardiovasc Pharmacol* 31(2): 195-202.
- Terrand J, Felley-Bosco E, Courjault-Gautier F, Rochat AC, Kucera P, Raddatz E (2003) Postanoxic functional recovery of the developing heart is slightly altered by endogenous or exogenous nitric oxide. *Mol Cell Biochem* 252(1-2): 53-63.
- Tohse N, Yokoshiki H, Sperelakis N (1998). Developmental Changes in Ion Channels. In: *Cell Physiology Source Book, Second Edition*, ed. Sperelakis N (Academic Press): p. 518-531.
- Tran L, Kucera P, de Ribaupierre Y, Rochat AC, Raddatz E (1996) Glucose is arrhythmogenic in the anoxic-reoxygenated embryonic chick heart. *Pediatr Res* 39(5): 766-773.
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM (2004) Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res* 95(3): 230-232.
- Tsuchida A, Miura T, Tanno M, Sakamoto J, Miki T, Kuno A, Matsumoto T, Ohnuma Y, Ichikawa Y, Shimamoto K (2002) Infarct size limitation by nicorandil: roles of mitochondrial K(ATP) channels, sarcolemmal K(ATP) channels, and protein kinase C. *J Am Coll Cardiol* 40(8): 1523-1530.

- Turrens JF, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191(2): 421-427.
- Uchiyama Y, Otani H, Wakeno M, Okada T, Uchiyama T, Sumida T, Kido M, Imamura H, Nakao S, Shingu K (2003) Role of mitochondrial KATP channels and protein kinase C in ischaemic preconditioning. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30(5-6): 426-436.
- van Oosterhout MF, Arts T, Muijtjens AM, Reneman RS, Prinzen FW (2001) Remodeling by ventricular pacing in hypertrophying dog hearts. *Cardiovasc Res* 49(4): 771-778.
- Vanagt WY, Cornelussen RN, Van Hunnik A, Delhaas T, Prinzen FW (2005) Ventricular pacing at physiological heart rate preconditions rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 38(6): 1079 (Abstract 223)).
- Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT (2000) Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res* 86(5): 541-548.
- Veenstra RD (1991) Developmental changes in regulation of embryonic chick heart gap junctions. *J Membr Biol* 119(3): 253-265.
- Vereckei A, Gogelein H, Wirth KJ, Zipes DP (2004) Effect of the cardioselective, sarcolemmal K(ATP) channel blocker HMR 1098 on atrial electrical remodeling during pacing-induced atrial fibrillation in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther* 18(1): 23-30.
- Wakahara N, Katoh H, Yaguchi Y, Uehara A, Satoh H, Terada H, Fujise Y, Hayashi H (2004) Difference in the cardioprotective mechanisms between ischemic preconditioning and pharmacological preconditioning by diazoxide in rat hearts. *Circ J* 68(2): 156-162.
- Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Uchiyama Y, Imamura H, Shingu K (2004) Adenosine and a nitric oxide donor enhances cardioprotection by preconditioning with isoflurane through mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent mechanisms. *Anesthesiology* 100(3): 515-524.
- Wang N, Minatoguchi S, Chen XH, Arai M, Uno Y, Lu C, Misao Y, Nagai H, Takemura G, Fujiwara H (2004a) Benidipine reduces myocardial infarct size involving reduction of hydroxyl radicals and production of protein kinase C-dependent nitric oxide in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 43(6): 747-757.
- Wang Y, Ahmad N, Kudo M, Ashraf M (2004b) Contribution of Akt and endothelial nitric oxide synthase to diazoxide-induced late preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(3): H1125-1131.

- Warshaw JB (1972) Cellular energy metabolism during fetal development. IV. Fatty acid activation, acyl transfer and fatty acid oxidation during development of the chick and rat. *Dev Biol* 28(4): 537-544.
- Weber NC, Toma O, Wolter JI, Obal D, Mullenheim J, Preckel B, Schlack W (2005) The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br J Pharmacol* 144(1): 123-132.
- Welin AK, Blad S, Hagberg H, Rosen KG, Kjellmer I, Mallard C (2005) Electrocardiographic changes following umbilical cord occlusion in the midgestation fetal sheep. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84(2): 122-128.
- Wiens D, Jensen L, Jasper J, Becker J (1995) Developmental expression of connexins in the chick embryo myocardium and other tissues. *Anat Rec* 241(4): 541-553.
- Wolin MS, Ahmad M, Gupte SA (2005) The sources of oxidative stress in the vessel wall. *Kidney Int* 67(5): 1659-1661.
- Xu Z, Cohen MV, Downey JM, Vanden Hoek TL, Yao Z (2001) Attenuation of oxidant stress during reoxygenation by AMP 579 in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(6): H2585-2589.
- Xu Z, Ji X, Boysen PG (2004) Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(4): H1433-1440.
- Yamada C, Xue Y, Chino D, Hashimoto K (2005) Effects of KB-R9032, a new Na(+)/H(+) Exchange Inhibitor, on Canine Coronary Occlusion/Reperfusion-Induced Ventricular Arrhythmias. *J Pharmacol Sci* 98(4): 404-410.
- Yao Z, McPherson BC, Liu H, Shao Z, Li C, Qin Y, Vanden Hoek TL, Becker LB, Schumacker PT (2001) Signal transduction of flumazenil-induced preconditioning in myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(3): H1249-1255.
- Yao Z, Tong J, Tan X, Li C, Shao Z, Kim WC, vanden Hoek TL, Becker LB, Head CA, Schumacker PT (1999) Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes. *Am J Physiol* 277(6 Pt 2): H2504-2509.
- Yarov-Yarovoy V, Paucek P, Jaburek M, Garlid KD (1997) The nucleotide regulatory sites on the mitochondrial KATP channel face the cytosol. *Biochim Biophys Acta* 1321(2): 128-136.
- Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, Kreutz R, Wang Y, Maleeff B, Parsons AA, Ohlstein EH (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275(48): 37895-37901.

- Yue Y, Qin Q, Cohen M, Downey J, Critz S (2002) The relative order of mK(ATP) channels, free radicals and p38 MAPK in preconditioning's protective pathway in rat heart. *Cardiovasc Res* 55(3): 681.
- Zaugg M, Schaub MC (2003) Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning. *J Muscle Res Cell Motil* 24(2-3): 219-249.
- Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL (2001) Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 89(12): 1177-1183.
- Zhang HY, McPherson BC, Liu H, Baman T, McPherson SS, Rock P, Yao Z (2002) Role of nitric-oxide synthase, free radicals, and protein kinase C delta in opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 301(3): 1012-1019.
- Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 265(27): 16330-16336.
- Zhou M, Tanaka O, Sekiguchi M, Sakabe K, Anzai M, Izumida I, Inoue T, Kawahara K, Abe H (1999) Localization of the ATP-sensitive potassium channel subunit (Kir6.1/uK(ATP)-1) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 74(1-2): 15-25.
- Zhuo ML, Huang Y, Liu DP, Liang CC (2005) KATP channel: relation with cell metabolism and role in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol* 37(4): 751-764.
- Zierler KL (1976) Fatty acids as substrates for heart and skeletal muscle. *Circ Res* 38(6): 459-463.

ANNEXES

Le travail présenté dans cette thèse a donné lieu aux articles et communications suivants:

Articles

Sarre A, Lange N, Kucera P, Raddatz E. (2005) MitoK_{ATP} channel activation in the postanoxic developing heart protects E-C coupling via NO-, ROS-, and PKC-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(4):H1611-1619.

Maury P, **Sarre A**, Terrand J, Rosa A, Kucera P, Kappenberger L, Raddatz E. (2004) Ventricular but not atrial electro-mechanical delay of the embryonic heart is altered by anoxia-reoxygenation and improved by nitric oxide. *Mol Cell Biochem.* 265(1-2):141-149.

Article associé

Sedmera D, Reckova M, deAlmeida A, Sedmerova M, Biermann M, Volejnik J, **Sarre A**, Raddatz E, McCarthy RA, Gourdie RG, Thompson RP. (2003) Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(4):H1152-60.

Communications orales

22-23/04/2004

- **21^{ème} Congrès "Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux", Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, La Baule, France.**

"Opening the mitoK_{ATP} channel selectively protects conduction and excitation-contraction coupling via ROS signaling in the anoxic-reoxygenated developing heart."

21-24/07/2003

- **Heart Failure 2003, International Society for Heart Research/European Society of Cardiology, Strasbourg, France.**

"The mitochondrial K_{ATP} channel is not involved in the oxidative burst induced by anoxia-reoxygenation in the embryonic heart."

Communications affichées

14-15/10/2005

11th Cardiovascular Biology and Clinical Implications Meeting, Novartis, Thun, Suisse.

Sarre A., Gardier S., Thomas A.C. and Raddatz E.

“MitoK_{ATP} channel opening differentially modulates JNK, ERK and p38 MAPK activation in the developing heart submitted to anoxia-reoxygenation”

22/24/06/2005

EUROPACE 2005 meeting, Prague, République Tchèque.

Sarre A., Maury P., Kappenberger L. and Raddatz E.

“Electrocardiographic characterization of the embryonic heart subjected to anoxia-reoxygenation: an in vitro model”

19-22/06/2005

ISHR 25th Meeting, Tromso, Norvège.

Raddatz E., Maury P., Kucera P., Kappenberger L. and **Sarre A.**

“Characterization of arrhythmias in the developing heart subjected to anoxia-reoxygenation.”

20-22/04/2005

22^{ème} Congrès Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Strasbourg, France.

Sarre A., Maury P., Kucera P., Kappenberger L. and Raddatz E.

“Characterization of arrhythmias in the developing heart subjected to anoxia-reoxygenation.”

20-25/08/04

ISHR international, Brisbane, Australia.

Sarre A. and Raddatz E.

“Mitochondrial K_{ATP} channel activation protects conduction and E-C coupling via ROS signaling and PKC in the anoxic-reoxygenated developing heart”.

22-23/04/2004

21^{ème} Congrès “Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux”, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, La Baule, France.

Sarre A. and Raddatz E.

“Opening the mitoK_{ATP} channel selectively protects conduction and excitation-contraction coupling via ROS signaling in the anoxic-reoxygenated developing heart.”

7-10/03/2004

Annual Scientific Session 2004. American College of Cardiology, New Orleans, Louisiana, USA.

Sarre A., Lange N., Kucera P. and Raddatz E.

“Opening of the mitochondrial K_{ATP} channel improves recovery of conduction and excitation-contraction coupling in the developing heart.”

23-25/10/2003

9th Cardiovascular Biology and Clinical Implications Meeting, Novartis, Interlaken, Suisse.

Sarre A., Gabioud H., Lange N. and Raddatz E.

“The mitochondrial K_{ATP} channel opener, diazoxide, enhances oxidative stress at reoxygenation and improves recovery of the developing heart.”

21-24/07/2003

Heart Failure 2003, International Society for Heart Research/European Society of Cardiology, Strasbourg, France.

Sarre A., Gabioud H., Lange N. and Raddatz E.

“The mitochondrial K_{ATP} channel is not involved in the oxidative burst induced by anoxia-reoxygenation in the embryonic heart.”

15-16/04/2003

20^{ème} Congrès “Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux”, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Grenoble, France.

Sarre A., Gabioud H., Lange N. and Raddatz E.

“Opening the mitochondrial K_{ATP} channel in the embryonic heart is pro-oxidant during reoxygenation but not under normoxia.”